



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

OTIMIZAÇÃO DA CARACTERIZAÇÃO DE FIBRAS MUSCULARES ESTRIADAS EM
CÃO (*Canis familiaris*) POR HISTOQUÍMICA E IMUNOHISTOQUÍMICA COM
POTENCIAL APLICAÇÃO AO DIAGNÓSTICO.

RITA VAZ RODRIGUES

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António José de Almeida Ferreira
Doutora Maria da Conceição da Cunha e
Vasconcelos Peleteiro
Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

ORIENTADORA

Doutora Maria da Conceição da
Cunha e Vasconcelos Peleteiro

CO-ORIENTADOR

Doutor Fernando António da Costa Ferreira

2016
LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

OTIMIZAÇÃO DA CARACTERIZAÇÃO DE FIBRAS MUSCULARES ESTRIADAS EM
CÃO (*Canis familiaris*) POR HISTOQUÍMICA E IMUNOHISTOQUÍMICA COM
POTENCIAL APLICAÇÃO AO DIAGNÓSTICO.

RITA VAZ RODRIGUES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António José de Almeida Ferreira
Doutora Maria da Conceição da Cunha e
Vasconcelos Peleteiro

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

ORIENTADORA

Doutora Maria da Conceição da Cunha e
Vasconcelos Peleteiro

CO-ORIENTADOR

Doutor Fernando António da Costa Ferreira

2016
LISBOA

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à Professora Doutora Maria da Conceição Peleteiro, minha orientadora, por todo o apoio, carinho e dedicação demonstrados, pela ajuda na escolha do tema e na escrita da presente dissertação.

Ao Professor Doutor Fernando Ferreira, meu coorientador, pela ajuda na escrita deste trabalho, pela força e motivação que sempre me conseguiu proporcionar e por todo o positivismo que cria em redor dos outros.

Ao Mestre Pedro Pereira, do Laboratório de Neuropatologia do Serviço de Neurologia do Hospital de Santa Maria, por todos os conhecimentos transmitidos e por toda ajuda prestada na realização das técnicas histoquímicas e do presente trabalho.

À Dra. Sandra Carvalho, um obrigado especial, não só por toda ajuda prestada na realização das técnicas imunohistoquímicas mas também por todos os conselhos dados e apoio, que faz dela o verdadeiro “anjo da guarda” dos estagiários.

A toda a restante equipa de técnicos, patologistas e professores do Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa pelo auxílio e amabilidade prestados e pelos ensinamentos transmitidos ao longo do período de estágio.

Um muito obrigado também à equipa de auxiliares, enfermeiros e médicos do Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa pela oportunidade de aprender e ganhar experiência na área de clínica de animais de companhia com um grupo tão dinâmico e divertido.

A toda a minha família, principalmente aos meus pais, por todo o amor, carinho e dedicação demonstrados todos os dias da minha vida, desde sempre, e por me incentivarem sempre a seguir os meus sonhos. Ao meu irmão, Rui, e aos meus sobrinhos, Beatriz e Henrique, um muito obrigado por me deixarem sempre de sorriso no rosto. Ao meu primo, Zé, por toda a amizade e momentos partilhados ao longo de todos estes anos.

A todos os meus amigos, com um agradecimento especial, à Mariana e à Sofia, que sabem sempre como me confortar e que irão sempre ocupar um lugar especial no meu coração.

Resumo

OTIMIZAÇÃO DA CARACTERIZAÇÃO DE FIBRAS MUSCULARES ESTRIADAS EM CÃO (*Canis familiaris*) POR HISTOQUÍMICA E IMUNOHISTOQUÍMICA COM POTENCIAL APLICAÇÃO AO DIAGNÓSTICO.

As técnicas histoquímicas permitem melhorar o conhecimento sobre o tecido muscular e suas alterações patológicas e, juntamente com as técnicas imunohistoquímicas, têm papel importante no diagnóstico de doenças musculares. Assim, o presente trabalho teve como objetivos, em primeiro lugar, caracterizar o tecido muscular esquelético da espécie canina, tanto a nível histoquímico como imunohistoquímico, incidindo, sobretudo, na tipificação e subtipificação das fibras musculares e avaliação das suas percentagens relativas. Em segundo lugar, pretendeu-se verificar a potencial aplicação de técnicas imunohistoquímicas no diagnóstico, aplicando-as em músculos alterados.

As técnicas histoquímicas realizadas foram: adenosina trifosfatase ácido resistente (ATPase 4,6), adenosina trifosfatase alcalina (ATPase 9,4) e desidrogenase *tetrazolium* redutase do ácido nicotínico (NADH diaforase). Estas foram efetuadas em cortes de congelação dos músculos temporal, masséter, diafragma e bíceps femoral de dois cães eutanasiados sem história de doença muscular. Os mesmos músculos destes cães foram também submetidos a imunohistoquímica, recorrendo aos anticorpos MHC-slow e MHC-fast. Posteriormente, estes anticorpos foram aplicados em três biópsias musculares de cães previamente diagnosticados com doença muscular.

Dos resultados obtidos pela histoquímica foi possível diferenciar fibras de tipo I e II, subtipificar as fibras tipo II e obter a percentagem de fibras tipo I e II nos diferentes músculos. Com a imunohistoquímica, registou-se a percentagem de células marcadas pelos anticorpos atrás referidos e a intensidade de cada marcação, consoante o músculo ou o caso clínico em questão. Não foi possível observar a existência de correlação entre as fibras de tipo I e II marcadas pela histoquímica e a marcação obtida por imunohistoquímica, não existindo igualmente correlação entre as percentagens de fibras marcadas pelos dois tipos de técnicas.

Finalmente, foram também identificadas as condições necessárias e suficientes para a realização das técnicas de diagnóstico de patologia muscular no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-ULisboa), reconhecendo-se as limitações e a forma de as ultrapassar.

Palavras-chave: cão, músculo estriado, fibras musculares, histoquímica, imunohistoquímica, doenças musculares.

Abstract

Optimization of the Characterization of Striated Muscle Fibers in Dog (*Canis familiaris*) by Histochemistry and Immunohistochemistry with Possible Application in the Diagnosis.

Histochemical techniques are able to increase the comprehension regarding normal and diseased muscular tissue and, together with immunohistochemical techniques, they have an important role in the diagnosis of muscular diseases. Therefore, the present work aimed, primarily, to characterize dog's musculoskeletal tissue, at the histochemical and immunohistochemical level, focusing, essentially, on the typification and subtypification of muscle fibers. Secondly, it was intended to apply immunohistochemical techniques to altered muscle tissue, in order to determine if these techniques can be used in the diagnosis of dog muscular diseases.

The following histochemical techniques were performed: adenosine triphosphatase at pH 4.6 (ATPase 4.6), adenosine triphosphatase at pH 9.4 (ATPase 9.4) and reduced nicotinamide adenine dinucleotide-tetrazolium reductase (NADH diaphorase). These techniques were performed in frozen sections of the temporalis, masseter, diaphragm and biceps femoris muscles that belonged to two dogs euthanized with no history of muscular disease. The same muscles were also submitted to immunohistochemical techniques, using the antibodies MHC-*slow* and MHC-*fast*. These antibodies were also applied to muscle biopsies of three dogs diagnosed with muscular disease.

Histochemistry made possible to differentiate type I and II fibers, to identify the subtypes of type II fibers and to determine the percentage of type I and II fibers in the different muscles. Immunohistochemistry, made possible to determine the percentage of marked cells by both antibodies. The intensity of stain was registered according to the muscle or the clinical case analyzed. However, it was not possible to obtain any correlation between the percentage of type I and II fibers marked by histochemistry and by immunohistochemistry or no correlation was found between the percentages of muscle fibers marked by both techniques.

Finally, the present study also allowed the identification of the conditions necessary and sufficient to perform these techniques in the diagnosis of muscle pathology to be put up in the Laboratory of Anatomical Pathology of the Faculty of Veterinary Medicine (University of Lisbon), recognizing its limitations and how to overcome them.

Key-words: dog, striated muscle, muscle fibers, histochemistry, immunohistochemistry, muscular diseases.

Índice Geral

Capítulo I – Introdução.....	1
Capítulo II – Breve Descrição das Atividades Desenvolvidas Durante o Estágio Curricular	2
1. Laboratório de Anatomia Patológica.....	2
2. Hospital Escolar da FMV-ULisboa	3
2.1. Casuística	4
Capítulo III – Revisão Bibliográfica	7
1. O músculo esquelético	7
1.1. Função do músculo esquelético.....	7
1.2. Estrutura do tecido muscular esquelético.....	7
1.3. Ultraestrutura das fibras musculares esqueléticas	8
1.4. Tipos de fibras musculares esqueléticas.....	9
2. Resposta do músculo às agressões.....	11
2.1. Fenómenos degenerativos e de necrose	11
2.2. Regeneração das fibras musculares esqueléticas	12
2.3. Alterações da Dimensão das Fibras Musculares.....	13
2.3.1. Atrofia.....	13
2.3.2. Hipertrofia.....	15
2.4. Alterações citomorfológicas das fibras musculares	15
3. Alterações <i>post mortem</i> do tecido muscular	16
4. Métodos para diagnóstico de doenças musculares	17
4.1. Sinais clínicos	17
4.2. Alterações clínico-patológicas.....	18
4.3. Eletromiografia.....	19
4.4. Biópsia muscular.....	20
4.4.1. Processamento das amostras de tecido muscular.....	22
4.4.2. Técnicas histoquímicas	23
4.4.3. Técnicas de imunohistoquímica	25

4.5. Microscopia eletrónica	25
5. Principais doenças musculares no cão.....	26
5.1. Miopatias congénitas e hereditárias	26
5.1.1. Distrofia muscular ligada ao cromossoma X	26
5.1.2. Miopatia centronuclear do Labrador Retriever	27
5.1.3. Miopatia do Boiadeiro de Flandres	28
5.1.2. Miopatia hereditária do Dogue Alemão.....	29
5.1.3. Miopatia distal do Rottweiler	30
5.1.4. Miotonia canina congénita.....	30
5.1.5. Miopatias metabólicas primárias.....	31
5.1.5.1. Doenças de armazenamento de glicogénio	32
5.1.5.2. Miopatias mitocondriais.....	33
5.1.5.3. Miopatias por armazenamento lipídico.....	33
5.1.5.4. Hipertermia maligna.....	34
5.2. Miopatias inflamatórias	35
5.2.1. Polimiosite imunomediada.....	35
5.2.2. Miosite dos músculos mastigadores (MMM)	36
5.2.3. Miosite dos músculos extraoculares (EOM).....	38
5.2.4. Dermatomiosite	39
5.3. Miopatias metabólicas adquiridas	40
5.3.1. Miopatia hipotiroideia.....	40
5.3.2. Miopatia corticosteroide.....	41
5.4. Alterações involuntárias do tónus muscular	41
5.4.1. Tetania e opistótonos	42
5.5. Doenças da junção neuromuscular	44
5.5.1. Miastenia gravis adquirida.....	44
5.6. Neoplasias do tecido muscular esquelético.....	45
5.6.1. Rabdomioma	45
5.6.2. Rabdomiossarcoma.....	46

Capítulo IV – Otimização da Caracterização de Fibras Musculares Estriadas em Cão por Histoquímica e Imunohistoquímica.	47
1. Introdução	47
2. Objetivos	48
3. Material e Métodos.....	49
3.1. Seleção e obtenção das amostras	49
3.2. Processamento das amostras.....	49
3.2.1. Técnica histológica de rotina	49
3.2.2. Técnicas de histoquímica	50
3.2.3. Técnicas de imunohistoquímica	53
4. Resultados	55
4.1. Técnica histológica de rotina.....	55
4.2. Técnicas de histoquímica.....	55
4.3. Técnicas de imunohistoquímica	58
4.4. Casos clínicos de doença muscular	63
4.4.1. Caso clínico I.....	63
4.4.2. Caso clínico II.....	63
4.4.3. Caso clínico III.....	64
4.4.4. Imunohistoquímica	66
5. Discussão.....	69
6. Conclusão	74
Referências Bibliográficas	75
Anexo I – Protocolo da técnica de coloração hematoxilina e eosina utilizada após a fixação do tecido muscular em formol.....	83
Anexo II – Protocolo da técnica ATPase 4,6.	84
Anexo III – Protocolo da técnica ATPase 9,4.	85
Anexo IV – Protocolo da técnica NADH-diaforase.	86
Anexo V – Protocolo da técnica de imunohistoquímica, recorrendo aos anticorpos primários MHC- <i>slow</i> e MHC- <i>fast</i>	87
Anexo VI – Contagem do tipo de fibras musculares (I e II) nos vários músculos, recorrendo à técnica ATPase 9,4.....	89

Anexo VII – Contagem de células marcadas pelos anticorpos MHC- <i>slow</i> e MHC- <i>fast</i> em vários músculos do canídeo A.	91
Anexo VIII – Contagem de células marcadas pelos anticorpos MHC- <i>slow</i> e MHC- <i>fast</i> em vários músculos do canídeo B.	94
Anexo IX – Contagem de células marcadas pelos anticorpos MHC- <i>slow</i> e MHC- <i>fast</i> , nos casos clínicos I, II e III.....	97

Índice de Figuras

Figura 1 - Diferentes Níveis de Organização do Músculo Esquelético (Adaptado de Klein, 2013).	8
Figura 2 - Representação esquemática da estrutura microscópica de uma miofibrilha (Adaptado de Cochran, 2011).	9
Figura 3 - Fixação de uma amostra de tecido muscular num disco de cortiça, com auxílio do meio de montagem OCT (Dubowitz et al., 2013).	22
Figura 4 - Dogue Alemão de 10 meses com miopatia hereditária (Shelton, 2007).	29
Figura 5 - Diafragma para o diagnóstico da miosite dos músculos mastigadores (MMM) (Adaptado de Shelton & Cardinet, 1990).	38
Figura 6 – Localização do músculo temporal (12) e masséter (14) no cão (Adaptado de Clair, 1986).	49
Figura 7 - Colocação dos fragmentos de tecidos muscular sobre discos de cortiça com goma adragante a 10% (Sigma®).	50
Figura 8 - Congelação do isopentano em azoto líquido (A) e imersão de uma das amostras de tecido muscular em isopentano (B).	51
Figura 9 - Crióstato Microm® HM550 com bloco de tecido muscular congelado.	51
Figura 10 – H&E em cortes de congelação (A) e em amostras fixadas em formol tamponado a 10% (B), ambas pertencentes ao músculo temporal (ampliação x 100). ..	55
Figura 11 - Técnicas histoquímicas realizadas nos músculos temporal e masséter. ..	56
Figura 12 - Técnicas histoquímicas realizadas no diafragma e no bíceps femoral. ..	57
Figura 13 - Imunomarcação com os anticorpos MHC- <i>slow</i> (A) e MHC- <i>fast</i> (B) no músculo temporal do canídeo A (ampliação x 40).	59
Figura 14 - Imunomarcação com os anticorpos MHC- <i>slow</i> (A) e MHC- <i>fast</i> (B) no músculo temporal do canídeo B (ampliação x 100).	60
Figura 15 - Imunomarcação com os anticorpos MHC- <i>slow</i> (A) e MHC- <i>fast</i> (B) no músculo masséter do canídeo A (ampliação x 40).	60
Figura 16 - Imunomarcação com os anticorpos MHC- <i>slow</i> (A) e MHC- <i>fast</i> (B) no músculo masséter do canídeo B (ampliação x 100).	60
Figura 17 - Imunomarcação recorrendo aos anticorpos MHC- <i>slow</i> (A) e MHC- <i>fast</i> (B) no diafragma do canídeo A (ampliação x 40).	61
Figura 18 - Imunomarcação recorrendo aos anticorpos MHC- <i>slow</i> (A) e MHC- <i>fast</i> (B) no diafragma do canídeo B (ampliação x 40).	61
Figura 19 - Imunomarcação com os anticorpos MHC- <i>slow</i> (A) e MHC- <i>fast</i> (B) no músculo bíceps femoral do canídeo A (ampliação x 100).	61

Figura 20 - Imunomarcção com os anticorpos MHC- <i>slow</i> (A) e MHC- <i>fast</i> (B) no músculo bicípede femoral do canídeo B (ampliação x 40).	62
Figura 21 - Caso clínico I – Cão. Masséter.	63
Figura 22 - Caso clínico II – Cão. Masséter.	64
Figura 23 – Caso clínico III – Cão. Membro Anterior (A) e Membro Posterior (B).....	65
Figura 24 - Caso clínico I: imunomarcção com os anticorpos MHC- <i>slow</i> (A) e MHC- <i>fast</i> (B) no masséter de um canídeo diagnosticado com processo degenerativo dos músculos mastigadores (ampliação x 40).	66
Figura 25 - Caso clínico II: imunomarcção com os anticorpos MHC- <i>slow</i> (A) e MHC- <i>fast</i> (B) no masséter de um canídeo com lipomatose dos músculos mastigadores (ampliação x 40).	67
Figura 26 - Caso clínico III: imunomarcção com os anticorpos MHC- <i>slow</i> (A) e MHC- <i>fast</i> (B) num músculo do membro anterior de um canídeo com necrose das fibras musculares (ampliação x 100).	67
Figura 27 - Caso clínico III: imunomarcção com os anticorpos MHC- <i>slow</i> (A) e MHC- <i>fast</i> (B) num músculo do membro posterior de um canídeo com necrose das fibras musculares (ampliação x 100).	67

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Frequência relativa das espécies animais presentes a consulta (n=400). ..	4
Gráfico 2 - Distribuição, por grupos etários, dos canídeos e felídeos observados em consulta (n=381).	5
Gráfico 3 - Distribuição dos casos de canídeos e felídeos por consulta de especialidade médico-veterinária (n=381).	6

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Principais colorações histoquímicas e respectivas aplicações no diagnóstico de doenças musculares (Adaptado de McGavin & Zachary, 2009; Paciello & Papparella, 2009).	24
Tabela 2 - Caracterização dos anticorpos primários utilizados.	54
Tabela 3 - Resultados obtidos nas técnicas ATPase 4,6, 9,4 e NADH diaforase, para os diferentes músculos analisados.	58
Tabela 4 - Contagem do número de fibras musculares do tipo I e II, nos vários músculos selecionados, recorrendo à técnica ATPase 9,4.	58
Tabela 5 - Percentagem (%) de células marcadas pelos anticorpos MHC- <i>slow</i> e MHC- <i>fast</i> , em vários músculos do canídeo A.....	59
Tabela 6 - Percentagem (%) de células marcadas pelos anticorpos MHC- <i>slow</i> e MHC- <i>fast</i> , em vários músculos do canídeo B.....	59
Tabela 7 - Intensidade de marcação geral para o MHC- <i>slow</i> e o MHC- <i>fast</i> nos vários músculos (temporal, masséter, diafragma e bicipede femoral) dos canídeos A e B....	62
Tabela 8 - Percentagem (%) de células marcadas pelos anticorpos MHC- <i>slow</i> e MHC- <i>fast</i> , nos músculos dos casos clínicos I, II e III.....	66
Tabela 9 - Intensidade de marcação encontrada, para o MHC- <i>slow</i> e o MHC- <i>fast</i> , nos músculos dos casos clínicos I, II e III.	68

Lista de Abreviaturas e Siglas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEC	3-amino-9-etilcarbazole
AST	Aspartato desidrogenase
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Adenosina trifosfatase
BID	<i>Bis in die</i> (duas vezes por dia)
CD8 ⁺	Núcleo de diferenciação 8 (linfócitos T-citotóxicos)
CK	Creatinina cinase
COX	Citocromo oxidase
DAB	Tetrahidrocloro de 3,3'-diaminobenzina
DM	Distrofias musculares
EMG	Eletromiografia
EOM	Miosite extraocular
FMV	Faculdade de Medicina Veterinária
FMV-ULisboa	Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa
H&E	Hematoxilina e eosina
HCl	Ácido clorídrico
HM	Hipertermia maligna
IgG	Imunoglobulina G
IM	Intramuscular
IV	Endovenosa
LES	Lúpus eritematoso sistémico
LDH	Lactato desidrogenase
M	Molaridade
MA	Membro anterior
ME	Microscopia eletrónica
MG	Miastenia gravis
MHC	<i>Myosin heavy chain</i>
MHC- <i>fast</i>	Antimiosina de cadeia pesada, isoforma rápida
MHC- <i>slow</i>	Antimiosina de cadeia pesada, isoforma lenta
MM	Músculos mastigadores
MMM	Miosite dos músculos mastigadores
MP	Membro posterior
MyoD	Proteína de diferenciação miogénica
N	Normalidade
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida)

NADH-TR	Desidrogenase <i>tetrazolium</i> redutase do ácido nicotínico
NaOH	Hidróxido de sódio
OCT	<i>Optimal cutting temperature compound</i>
PAS	Ácido periódico-Schiff
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDP 1	Piruvato desidrogenase fosfatase 1
PKF	Fosfofrutoquinase
PO	<i>Per os</i> (via oral)
q6h	<i>Quaque sex hora</i> (a cada 6 horas)
q8h	<i>Quaque octō hora</i> (a cada 8 horas)
q12h	<i>Quaque duodēcim hora</i> (a cada 12 horas)
RM	Ressonância magnética
SDH	Sucinato desidrogenase
SID	<i>Semel in die</i> (uma vez por dia)
TAC	Tomografia axial computadorizada
U/Kg	Unidades por quilograma

Capítulo I – Introdução

Antes de serem avaliadas amostras de biópsias musculares, provenientes de canídeos com suspeita de doença muscular, é importante estabelecer quais são as características citoquímicas, histoquímicas e morfométricas normais dos diferentes músculos, de forma a se poderem determinar, de facto, quais as alterações causadas pela doença (Braund, McGuire, & Lincoln, 1982). O desenvolvimento de técnicas histoquímicas enzimáticas especializadas, utilizando cortes de congelação, aumentou significativamente a compreensão tanto do tecido muscular normal como dos processos patológicos presentes em muitas doenças musculares (Dickinson & LeCouteur, 2010). Associadas às técnicas histoquímicas, também as técnicas imunohistoquímicas têm tido papel importante no diagnóstico destas afeções (Paciello & Papparella, 2009).

Esta dissertação tem como objetivo, primeiramente, caracterizar o tecido muscular da espécie canina, tanto a nível histoquímico como imunohistoquímico, incidindo, principalmente, na tipificação e subtipificação das fibras musculares esqueléticas. Posteriormente, aplicando técnicas imunohistoquímicas em biópsias musculares de canídeos diagnosticados com doença muscular, pretende-se verificar se estas têm ou não potencial aplicação ao diagnóstico.

O presente trabalho começa com uma breve descrição das atividades desenvolvidas durante o estágio curricular, tanto no laboratório de Anatomia Patológica como no Hospital Escolar, ambos localizados na FMV-ULisboa. Depois, segue-se o capítulo da revisão bibliográfica que começa por descrever quais as características estruturais e ultraestruturais do tecido muscular esquelético. De seguida, são retratadas diversas formas do músculo responder às agressões e que alterações *post mortem* sofre este tecido. Posteriormente, são descritos métodos para diagnóstico e principais doenças musculares na espécie canina. Já no capítulo IV encontra-se o trabalho experimental, que se debruça, essencialmente, em técnicas de histoquímica, técnicas de imunohistoquímica e utilização da imunohistoquímica em casos de doença muscular.

Capítulo II – Breve Descrição das Atividades Desenvolvidas Durante o Estágio Curricular

1. Laboratório de Anatomia Patológica

Parte das atividades realizadas no estágio curricular foram desenvolvidas no Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-ULisboa e decorreram no período compreendido entre 7 de Setembro de 2015 e 11 de Março de 2016.

O trabalho efetuado, neste estágio, tinha como objetivo a montagem das técnicas histoquímicas, necessárias para o diagnóstico de doenças musculares em cão, no Laboratório de Anatomia Patológica da FMV. Desta forma, começou-se por identificar quais as técnicas histoquímicas necessárias para a tipificação das fibras musculares esqueléticas. De igual forma, foi também necessário definir quais os músculos a biopsar, como deveriam ser processadas as amostras de tecido muscular e como estas teriam de ser acondicionadas e transportadas. Conclui-se que, para as colorações histoquímicas escolhidas, era necessário recorrer a cortes de congelação, com auxílio de um crióstato. Inicialmente, os cortes de congelação e as colorações histoquímicas começaram por ser realizadas no Laboratório de Neuropatologia do Serviço de Neurologia do Hospital de Santa Maria, com auxílio do Mestre Pedro Pereira. Mais tarde, as técnicas histoquímicas foram igualmente desenvolvidas no Laboratório de Anatomia Patológica da FMV. É importante referir que estas técnicas histoquímicas foram apenas aplicadas em cães sem patologia muscular, que eram submetidos a eutanásia, por outro motivo, no Hospital Escolar da FMV. Apesar de se ter sido efetuada pesquisa e recolha de casos de arquivo da VetPat (Laboratório de Anatomia Patológica Veterinária) de canídeos diagnosticados com doença muscular, estes não puderam ser submetidos a estas técnicas, pois os cortes do tecido muscular foram fixados em formol tamponado a 10%. É de salientar que as técnicas histoquímicas utilizadas tiveram por base aquelas aplicadas na Medicina Humana e, portanto, tiveram de ser otimizadas, de forma a se obter uma correta coloração do músculo da espécie canina.

Para complementar os resultados obtidos pela histoquímica foram também aplicadas técnicas de imunohistoquímica no músculo destes cães. Foram utilizados dois anticorpos, o MHC-*s/ow* e o MHC-*fast*, que serviram, maioritariamente, para facilitar a tipificação das fibras musculares esqueléticas. Depois de aferida a técnica de imunohistoquímica, foi também possível utilizá-la em biópsias musculares de três casos de arquivo, obtidos no Laboratório VetPat.

Por fim, fez-se a análise dos resultados recorrendo à contagem de células marcadas pela histoquímica e imunohistoquímica e efetuada a comparação dos resultados obtidos. Tiraram-se as devidas conclusões e cada técnica foi avaliada, tendo sido enumeradas as limitações das mesmas.

2. Hospital Escolar da FMV-ULisboa

Parte do estágio curricular, que permitiu a realização desta dissertação, decorreu igualmente no Hospital Escolar da FMV-ULisboa e teve início a 7 de Setembro de 2015, tendo terminado a 29 de Janeiro de 2016.

Os principais objetivos do Hospital Escolar da FMV-ULisboa são, primeiramente, prestar serviço à comunidade na qual se insere, de modo a zelar pela saúde e bem-estar animal e, em segundo lugar, auxiliar na formação de médicos veterinários. Este centro de atendimento Médico Veterinário está aberto 24h por dia e 365 dias por ano. O horário normal de consultas é de segunda a sexta-feira, a partir das 8 horas e sábado a partir das 9h, podendo ser efetuada marcação prévia de uma consulta. O serviço de urgência tem início a partir das 21 horas nos dias úteis, a partir das 17 horas de sábado e durante todo o dia aos domingos e feriados.

No funcionamento do Hospital Escolar estão envolvidos professores, médicos veterinários, enfermeiros, auxiliares, alunos e estagiários. Normalmente a receção do paciente é feita por estagiários que começam por recolher a história clínica, realizar a anamnese e o exame clínico de estado geral do animal. Depois, o médico veterinário presta auxílio ao estagiário de modo a que sejam efetuados os exames complementares necessários e para que se alcance o correto diagnóstico e tratamento da doença em curso.

Neste Hospital Veterinário realizam-se consultas de primeira opinião, consultas de referência e consultas de segunda opinião. Para tal estão disponíveis várias especialidades, nomeadamente, cardiologia, comportamento animal, dermatologia, endocrinologia, medicina de animais exóticos, neurologia, oftalmologia, oncologia, ortopedia, reprodução e obstetrícia, entre outras. Estão também disponíveis vários meios de diagnóstico, entre eles, análises clínicas, imagiologia (raio X, TAC, ecografia), bacteriologia, parasitologia, anatomia-patológica e citologia. O Hospital possui um serviço de internamento e está capacitado para a realização de cirurgia de rotina e das variadas áreas médico-veterinárias.

Desta forma, o estágio no Hospital Escolar da FMV-ULisboa permitiu-me cimentar conhecimentos científicos e técnicos na área de Clínica de Animais de Companhia. Este estágio foi igualmente importante para desenvolver a componente prática, pois foi possível realizar várias atividades médico-veterinárias, como a colocação de cateteres, a venopunção periférica, a intubação orotraqueal, a administração de vacinas e a injeção de medicação via subcutânea e intramuscular. Os profissionais do Hospital Escolar da FMV-ULisboa para além de manterem os seus conhecimentos científicos e técnicos permanentemente atualizados têm a capacidade de os partilhar com os estagiários e todo o corpo clínico, dinamizando bastante a metodologia de aprendizagem.

2.1. Casuística

Dos animais que se apresentaram a consulta, o cão e o gato foram as duas espécies mais frequentes. Desta forma, foram observados 277 canídeos e 104 felídeos. Contudo, foram também tidas em conta as consultas da especialidade de medicina de animais exóticos. Desta forma, foram observadas 19 consultas de exóticos, entre os quais estão incluídos 11 pequenos mamíferos (6 coelhos, 1 chinchila, 2 cobaios e 2 hamsters sírios), 4 répteis (3 tartarugas e 1 camaleão) e 4 aves (2 canários, 1 periquito-comum e 1 papagaio cinzento). O gráfico 1 evidencia a frequência relativa das espécies animais presentes a consulta.

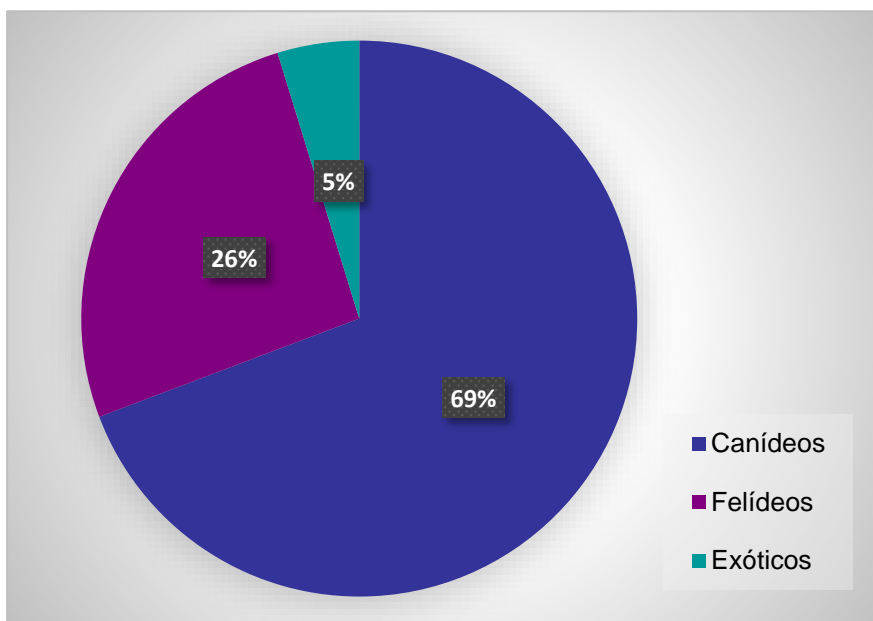


Gráfico 1 - Frequência relativa das espécies animais presentes a consulta (n=400).

Posteriormente, os canídeos e felídeos observados em consulta foram distribuídos e agrupados por idades. Dos 277 canídeos acompanhados em consulta, o mais novo tinha 2 meses e o mais velho 16 anos. Quanto aos 104 felídeos, o mais jovem tinha 2 meses e o mais velho 18 anos.

Como mostra o gráfico 2, grande parte dos canídeos tinham idades compreendidas entre os 6 e os 12 anos. Foram também observados muitos canídeos com 1 a 3 anos de idade. Por outro lado, os felídeos observados em consulta tinham, maioritariamente, até 1 ano de idade.

Apesar da amostra de felídeos ser apenas de 104 animais, pode ser especulado que os donos de felídeos trazem o seu animal ao Hospital Escolar da FMV-ULisboa principalmente para efetuar as primeiras consultas. Estas consultas são aquelas em que se costuma realizar um programa de vacinação e de desparasitações e onde é comum tirar dúvidas acerca da alimentação, esterilização, entre outros. Já os donos dos canídeos, com base nos dados obtidos durante o período de estágio, trazem os seus animais numa fase etária mais avançada, pressupondo que o principal motivo para se deslocarem a este CAMV será pela presença de doença dos seus companheiros.

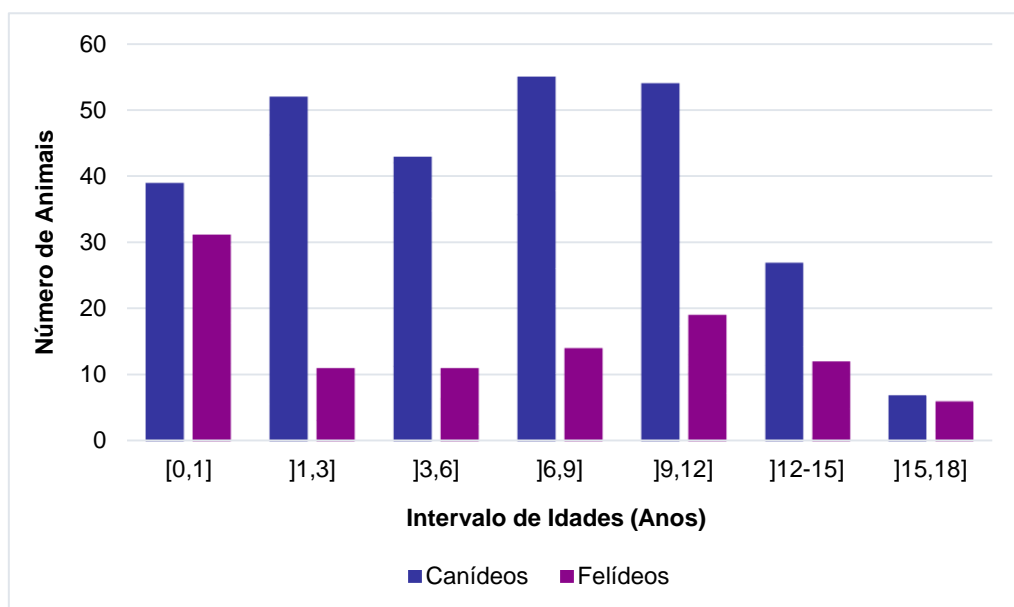


Gráfico 2 - Distribuição, por grupos etários, dos canídeos e felídeos observados em consulta (n=381).

Dos 277 canídeos acompanhados em consulta, 60% (165) eram do género masculino e 40% (112) do género feminino. No caso dos felídeos, verificou-se que, dos 104 gatos acompanhados, 62,5% (65) eram machos e 37,5% (39) fêmeas.

Das consultas observadas durante o presente estágio, foram contabilizadas um total de 45 raças de canídeos e 7 raças de felídeos. Assim, há 86 cães de raça indeterminada, o que equivale a, aproximadamente, 31% do total de canídeos presentes nesta casuística. Posteriormente, as raças mais encontradas foram o Labrador Retriever (11,2%), o Caniche (6,5%), o *Yorkshire Terrier* (6,1%), o *Bulldog* Francês (5,1%) e o Boxer (4,3%). No caso dos felídeos foram registados 88 de raça indeterminada, o que equivale a 84,6% do total de gatos observados em consulta. Depois, as três raças mais visualizadas foram o Persa (8,7%), o *British Shorhair* (1,9%) e o Bosques da Noruega (1,9%).

No que toca às especialidades médico-veterinárias, foram registados casos clínicos nas seguintes áreas: consultas de vacinação, dermatologia, gastroenterologia, oncologia, oftalmologia, imagiologia, ortopedia, neurologia, pneumologia, doenças infecciosas e parasitárias, cardiologia, nefrologia e urologia, reprodução e obstetrícia, traumatologia, consultas de rotina, endocrinologia, odontologia, comportamento animal e músculo esquelético.

Logo, o gráfico 3 pretende retratar em que tipo de consulta se inserem os canídeos e felídeos que foram assistidos no Hospital Escolar da FMV-ULisboa, com base nas especialidades médico-veterinárias acima referidas. Em primeiro lugar é possível concluir que as consultas de vacinação foram as mais comumente observadas para a espécie canina. Depois, a especialidade médico-veterinária que apresentou um maior número de consultas foi a dermatologia. Relativamente à espécie felina foram igualmente as consultas de vacinação as mais frequentadas. Depois, as especialidades de gastroenterologia e nefrologia e urologia são as mais requisitadas no que toca

aos felídeos assistidos no Hospital Escolar da FMV-ULisboa. É igualmente importante referir que não foram registadas consultas de felídeos na área de traumatologia, nem do foro muscular esquelético.

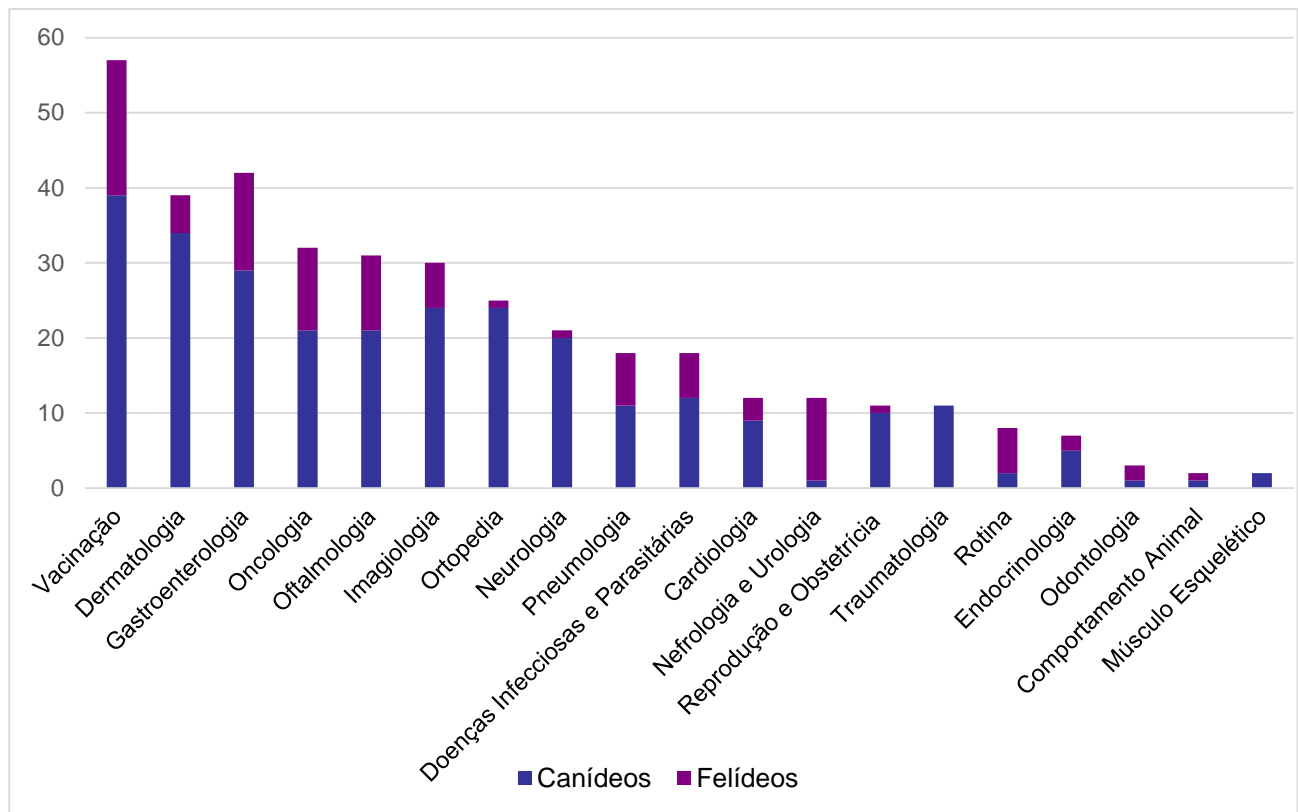


Gráfico 3 - Distribuição dos casos de canídeos e felídeos por consulta de especialidade médico-veterinária (n=381).

Capítulo III – Revisão Bibliográfica

1. O músculo esquelético

1.1. Função do músculo esquelético

O músculo esquelético é um tecido metabolicamente complexo que apresenta maioritariamente duas funções. A primeira é a contração, que permite a manutenção da postura e a possibilidade de movimento. A segunda é contribuir para a homeostasia ao constituir uma reserva de aminoácidos que está envolvida no metabolismo da glucose e na gliconeogénese hepática (McGavin & Valentine, 2009; Shelton & Cardinet, 1987). Por fim, é importante referir que a contração dos músculos respiratórios, os intercostais e o diafragma, é fulcral para a função respiratória, logo, para a vida (McGavin & Valentine, 2009).

1.2. Estrutura do tecido muscular esquelético

A estrutura do tecido muscular vai permitir o normal funcionamento do músculo (McGavin & Valentine, 2009). Este é constituído por fibras musculares (Figura 1) de dimensão variável consoante a idade, o nível de exercício físico praticado, o estado nutricional, o posicionamento e a função do músculo em questão (Vleet & Valentine, 2007).

Microscopicamente, na periferia das fibras musculares, podem ser observados vários núcleos responsáveis pelo controlo dos processos fisiológicos dos constituintes celulares. Ao longo do comprimento da fibra muscular encontram-se as células-satélite, localizadas entre a membrana plasmática (sarcolema) e a lâmina basal (McGavin & Valentine, 2009). Estas células possuem um papel fundamental na reparação e regeneração das fibras musculares, pois pensa-se tratarem-se das únicas células a nível muscular que, após o nascimento, mantêm capacidade mitótica. Assim, as células-satélite são capazes de se dividir, fundir e formar células musculares maduras. Recentemente foi também demonstrado que, células pluripotentes da medula óssea podem, igualmente, participar na regeneração do músculo esquelético (Vleet & Valentine, 2007). Por último, é sabido que cada fibra muscular é envolvida por uma lâmina basal que, por sua vez, é rodeada pelo endomísio, uma camada fina de tecido conjuntivo com capilares. Adicionalmente, as fibras musculares organizam-se em fascículos que estão rodeados pelo perimísio, uma camada um pouco mais espessa de tecido conjuntivo que a anterior. O músculo é ainda rodeado pelo epimísio, uma fáscia de tecido conjuntivo que se vai unir com o tendão do músculo e que constitui uma parte integrante da função contrátil do tecido muscular, visto armazenar e retransmitir a força gerada pela contração da fibra muscular (McGavin & Valentine, 2009).

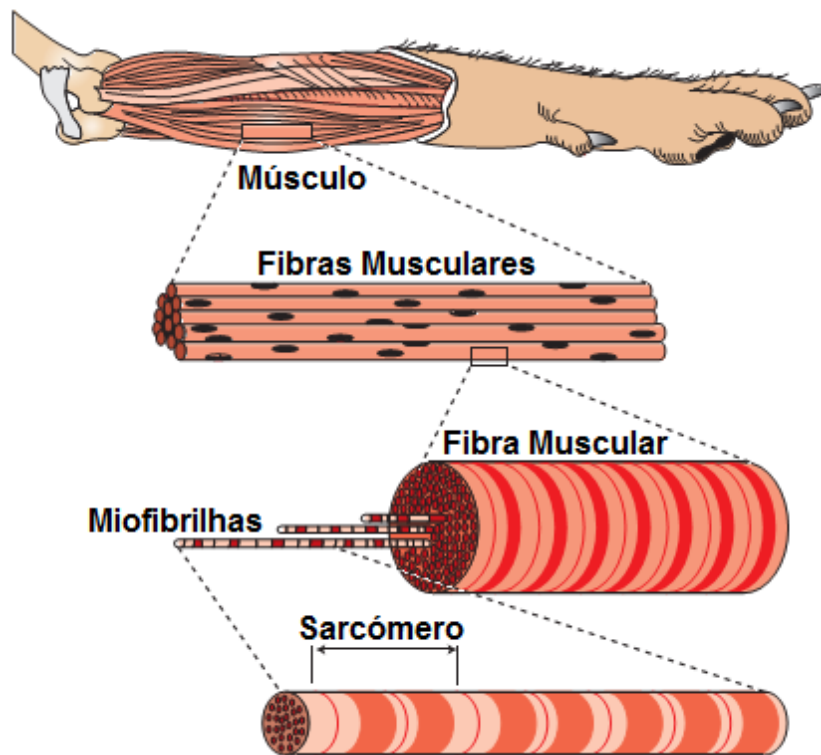


Figura 1 - Diferentes Níveis de Organização do Músculo Esquelético (Adaptado de Klein, 2013).

1.3. Ultraestrutura das fibras musculares esqueléticas

Cada fibra muscular é composta por miofibrilas estriadas (Figura 2) que apresentam na sua constituição miofilamentos de actina e miosina (McGavin & Valentine, 2009). A unidade contrátil fundamental é o sarcômero, um conjunto de miofilamentos responsável pelo padrão estriado das miofibrilas. O sarcômero possui, em cada uma das suas terminações, uma banda Z e, no centro, a banda A contendo miofilamentos espessos. A união de duas bandas Z de diferentes sarcômeros dá origem a uma banda I, menos espessa, composta por filamentos finos (Shelton & Cardinet, 1987). A zona central entre os miofilamentos finos, em que apenas miofilamentos espessos são visíveis é denominada por banda H (Vleet & Valentine, 2007). No centro da banda H encontra-se a linha M, que corresponde a ligações laterais entre filamentos espessos adjacentes (Junqueira & Carneiro, 2008). A miosina é o principal constituinte dos filamentos espessos. Já os filamentos finos são compostos por actina, troponina e tropomiosina. Já a banda Z apresenta na sua constituição principalmente alfa-actina, o que permite a união dos filamentos finos. A troponina é uma proteína com capacidade de se ligar ao cálcio e que, em combinação com a tropomiosina, regula a atividade contrátil da maioria dos músculos. Isto porque, em conjunto, estas proteínas vão controlar a interação entre as proteínas miofibrilares actina e miosina. Através da hidrólise do ATP, a actina e a miosina são responsáveis pela transformação de energia química em energia mecânica, quando há contração muscular (Shelton & Cardinet, 1987).

O retículo endoplasmático das fibras musculares é denominado retículo sarcoplasmático e constituído por sarcotúbulos. Este sofre modificações para poder criar cisternas terminais onde tem

lugar o sequestro de íons de cálcio, essenciais para iniciar a interação entre os filamentos de actina e de miosina. Também a membrana plasmática das células musculares passa a ser denominada sarcolema. As invaginações do sarcolema que atravessam a célula chamam-se túbulos T e permitem a transmissão rápida de um potencial de ação para toda a fibra muscular. As cisternas terminais de dois sarcômeros adjacentes, juntamente com o túbulo T formam uma tríade (McGavin & Valentine, 2009).

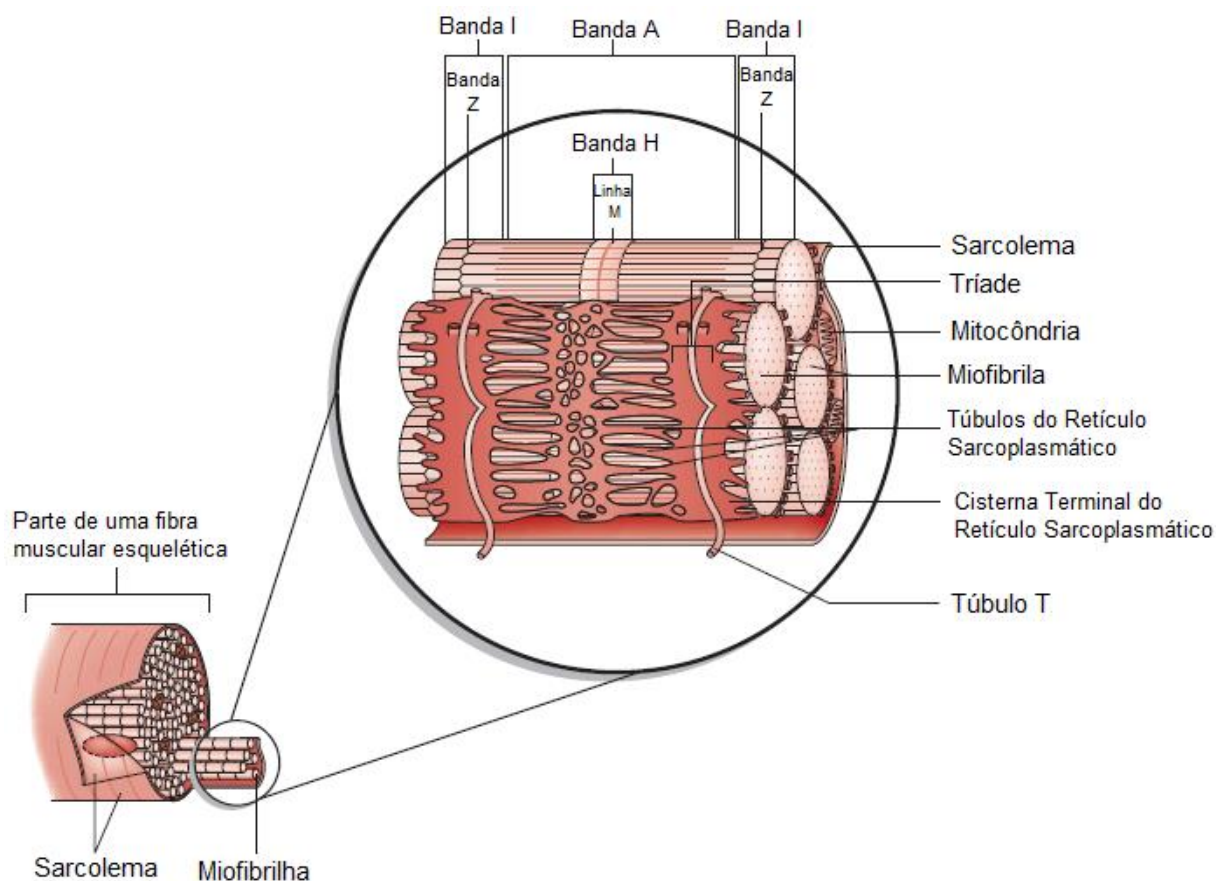


Figura 2 - Representação esquemática da estrutura microscópica de uma miofibrilha (Adaptado de Cochran, 2011).

1.4. Tipos de fibras musculares esqueléticas

Vários sistemas têm sido aplicados para classificar os tipos de fibras presentes no músculo esquelético de animais adultos vertebrados (Snow et al., 1982). Uma classificação comum tem por base três características fisiológicas principais, nomeadamente, a frequência de contração (rápida ou lenta), a frequência de fadiga (rápida ou lenta) e, por fim, o tipo de metabolismo (oxidativo, glicolítico ou misto) (McGavin & Valentine, 2009). Com base nestas diferenças das suas propriedades físicas e metabólicas, uma combinação de técnicas histoquímicas com propriedades físicas e metabólicas permite, na maioria das espécies, classificar as fibras em tipo I, tipo IIA e tipo IIB. Assim, as fibras tipo I apresentam metabolismo oxidativo, são ricas em mitocôndrias e pertencem às unidades motoras de contração lenta, resistentes à fadiga. Já as fibras do tipo II são glicolíticas e têm um menor número de mitocôndrias. Estas fibras podem ser subdivididas no tipo

IIA e IIB. As fibras IIA são mistas, logo apresentam metabolismo oxidativo-glicolítico, o que faz com que sejam fibras de contração rápida e desgaste lento. Relativamente às fibras do tipo IIB estas são puramente glicolíticas, de contração rápida e desgaste igualmente rápido (McGavin & Valentine, 2009; Snow et al., 1982). Por fim, tem sido descrito um tipo de fibras IIC, também denominadas por fibras transicionais, por serem consideradas os precursores primitivos das outras fibras musculares. Contudo, não estão presentes em todos os músculos e representam apenas 2% das fibras musculares no cão (Braund et al., 1982; Snow et al., 1982). Noutras espécies, em particular no ser humano, estas fibras têm importância na avaliação de processos regenerativos de resposta a alterações patológicas, sendo por isso na prática clínica solicitada a sua tipagem.

A técnica histoquímica indicada para identificar as diferentes atividades biológicas das fibras musculares recorre à identificação de uma enzima transportadora de cálcio, denominada em linguagem comum por ATPase, sendo contudo o seu nome oficial ATPase transportadora de cálcio (EC 3.6.3.8). Existem duas isoformas, no que diz respeito ao seu funcionamento fisiológico, a forma alcalina e a ácido resistente. É com base na identificação do funcionamento da ATPase que é possível a tipificação das fibras musculares. Por outro lado, a técnica que utiliza a desidrogenase *tetrazolium* redutase do ácido nicotínico (NADH-TR), uma enzima presente em diversos metabolismos, e que se localiza no retículo intermiofibrilar, é ideal para avaliar a atividade enzimática oxidativa (Vleet & Valentine, 2007).

É de salientar que, consoante o músculo em questão, assim varia a percentagem de cada tipo de fibra. As fibras do tipo I são mais abundantes em músculos destinados a realizarem uma atividade lenta e prolongada, como é o caso dos músculos posturais (localizados nos membros) e do diafragma. Já as fibras do tipo II predominam em músculos de contração rápida e mantêm-se ativas por curtos períodos de tempo (McGavin & Valentine, 2009).

É importante referir que, na espécie canina, a existência das clássicas fibras IIB é controversa. Tal ocorre porque, em primeiro lugar, a técnica ATPase após pré-incubação ácida e/ou alcalina nem sempre permite a diferenciação dos tipos IIA e IIB. O facto do tecido muscular da espécie canina ser extremamente sensível a pequenas variações de pH, temperatura e molaridade das soluções tampão (especialmente aquelas usadas na pré-incubação) e ao tempo de incubação, dificulta a padronização dos tipos de fibras musculares. Contudo, com o ajuste preciso do pH dos tampões, mantendo a temperatura ambiente a 25 °C ou inferior, e com a realização detalhada de cada procedimento, é possível, na maioria dos casos, obter a subtipificação das fibras tipo II. Por outro lado, a interpretação do potencial oxidativo das fibras tipo II recorrendo às reações NADH-TR ou com a succinato desidrogenase (SDH) é variável. Enquanto alguns autores defendem que todas as fibras do tipo II têm um potencial oxidativo moderado a alto, outros afirmam que também existem fibras deste tipo com capacidade oxidativa baixa (Snow et al., 1982). Segundo Latorre et al. (1993), as fibras do tipo IIB das outras espécies de mamíferos não correspondem às mesmas fibras do cão, sendo denominadas nesta espécie por IIDog. Apesar da capacidade metabólica das fibras tipo IIB

ser semelhante à das fibras *IIDog*, sabe-se que a isoforma da cadeia pesada da miosina (MHC) não é a mesma (Snow et al., 1982). Enquanto as fibras IIB expressam MHC 2B, as fibras *IIDog* expressam MHC 2X, o que, pode interferir nos resultados da técnica imunohistoquímica devido à limitada especificidade dos anticorpos antimiosina, o que não impede que a esta técnica possa ser útil na tipificação das fibras musculares (Toniolo et al., 2007).

A diferenciação das fibras musculares recorrendo à imunohistoquímica baseia-se na utilização de anticorpos específicos para isoformas da cadeia pesada da miosina. A utilização desta técnica revela que os tipos de fibras musculares ultrapassam o número que é reconhecido histoquimicamente. As isoformas de miosina incluem a neonatal, a de contração lenta e cinco isoformas distintas de contração rápida. Enquanto a isoforma MHC-1 corresponde às fibras musculares tipo I obtidas a partir das técnicas histoquímicas, as isoformas MHC-2A e MHC-2X correspondem às fibras tipo IIA e *IIDog* (Štrbenc, Smerdu, Pogačnik, & Fazarinc, 2006). As isoformas do tipo MHC 2A, 2B e 2X estão presentes na maioria dos músculos esqueléticos do organismo, enquanto a isoforma MHC 2M se encontra nos músculos mastigadores dos carnívoros e a MHC 2EOM nos músculos extraoculares (Kaneko, Harvey, & Bruss, 2008). Como tinha sido referido anteriormente, no tecido muscular canino, as fibras do tipo IIB identificadas pelas técnicas de histoquímica não correspondem às fibras tipo 2B reconhecidas pela coloração imunohistoquímica para a miosina de cadeia pesada, mas sim às fibras tipo 2X (Toniolo et al., 2007). Para além da falta de correlação entre os resultados da histoquímica e da imunohistoquímica, os padrões de contratilidade das isoformas proteicas e a atividade enzimática no músculo em desenvolvimento ou com alterações patológicas não estão correlacionadas com o tipo de fibras musculares padrão. Assim, apesar das técnicas histoquímicas fornecerem informações importantes quanto às propriedades morfológicas, bioquímicas e metabólicas das fibras musculares, apresentam limitações no que à classificação das fibras diz respeito (Kaneko et al., 2008).

2. Resposta do músculo às agressões

O músculo é o tecido mais adaptável do corpo (Gopalakrishna Rao, 2010). Contudo, a capacidade de resposta das fibras musculares é limitada, o que leva a que muitas das alterações histopatológicas observadas em diferentes doenças musculares, se repitam (Vleet & Valentine, 2007). Quando sujeito a agressões, o tecido muscular tem capacidade para necrosar ou regenerar. Contudo, as fibras musculares podem também atrofiar ou hipertrofiar, repartirem-se, submeterem-se a uma série de alterações morfológicas e, ainda, alterar as suas funções fisiológicas, transformando-se noutra tipo de fibra muscular (McGavin & Valentine, 2009).

2.1. Fenómenos degenerativos e de necrose

A degenerescência de uma fibra muscular pode envolver as estruturas da célula no todo ou em parte e, frequentemente, ocorre de forma segmentar ao longo do comprimento da fibra muscular

(Gopalakrishna Rao, 2010). Há quatro níveis de degenerescência segmentar, sendo que o primeiro envolve apenas fenómenos degenerativos ao nível da fibra muscular, da fibra muscular e do sarcoplasma, deixando a lâmina basal, os mionúcleos e as células satélites viáveis. O nível seguinte de degenerescência deixa apenas as células satélite e a lâmina basal intactas. Já o terceiro nível leva à destruição das células satélite e o quarto promove a destruição segmentar, não só das células do endomísio, como também dos capilares. Desta forma, a resposta à agressão vai ser diferente consoante o nível de degenerescência induzido (Vleet & Valentine, 2007).

A degenerescência de uma fibra está frequentemente associada a alterações das membranas celulares e pode vir acompanhada também por necrose (Braund et al., 1982). As porções necrosadas das fibras musculares podem apresentar diversas aparências histológicas. Inicialmente, em cortes transversais, são visíveis hipercontrações segmentares, em que o diâmetro das fibras se torna ligeiramente maior, sendo em cortes longitudinais, frequentemente observada a “torção” das fibras afetadas. Por outro lado, o citoplasma de fibras necrosadas costuma ser homogeneamente eosinofílico (degenerescência hialina), com perda da estriação citoplasmática e dos mionúcleos adjacentes (McGavin & Valentine, 2009).

É comum os tecidos necrosados sofrerem mineralização, isto porque o cálcio é libertado pelas fibras musculares necrosadas, à medida que as mitocôndrias saturadas deste catião se vão desintegrando (Vleet & Valentine, 2007). No exame histológico, as fibras musculares mineralizadas podem apresentar no seu interior grânulos basofílicos ou material cristalino. Recorrendo a colorações histoquímicas, como o vermelho de alizarina S e Von Kossa, pode confirmar-se, de facto, que há mineralização das fibras musculares. Se forem efetuadas técnicas de histoquímica em cortes de congelação de músculo, é possível detetar o aumento do cálcio intracitoplasmático nas fibras musculares danificadas que não estejam mineralizadas ou necrosadas. É importante salientar que a mineralização do tecido muscular deve ser considerada uma resposta inespecífica, sendo apenas um indicativo de que há necrose da fibra muscular, sem especificidade para o diagnóstico do processo inerente.

Se o tecido muscular danificado apresentar bom suprimento sanguíneo, será invadido por macrófagos, recrutados pelas citocinas libertadas pelas próprias células musculares. A função dos macrófagos é limpar os detritos citoplasmáticos e eliminar o tecido danificado. Juntamente com os macrófagos, outros leucócitos, como neutrófilos, eosinófilos e linfócitos podem igualmente ser recrutados (McGavin & Valentine, 2009; Vleet & Valentine, 2007).

2.2. Regeneração das fibras musculares esqueléticas

A capacidade de autorregeneração do músculo é extraordinária, considerando que é um tecido altamente especializado, que as células são muito longas e que há uma grande vulnerabilidade das fibras musculares. A capacidade de rapidamente reparar um segmento danificado de uma fibra

muscular sem, aparentemente, afetar o resto da fibra, é uma característica incomparável relativamente ao resto dos tecidos do organismo (Gopalakrishna Rao, 2010).

Os principais intervenientes no processo regenerativo são os macrófagos que circulam na corrente sanguínea, as células satélite (que são as únicas células do tecido muscular que ainda possuem atividade mitótica) e a lâmina basal. É a integridade da lâmina basal que determina inicialmente o quão eficaz vai ser o processo regenerativo e se o resultado final vão ser fibras regeneradas ou se o tecido muscular será substituído por tecido fibroso (total ou parcialmente) (Vleet & Valentine, 2007). Uma lâmina basal intacta permite a passagem de macrófagos para o seu interior, mantém os mioblastos e os núcleos no interior das células e ainda impede a passagem de células fibroblásticas para o interior da fibra (Gopalakrishna Rao, 2010).

Perante uma lâmina basal intacta o processo regenerativo inicia-se com a ativação das células satélite que, se sofrem mitose, passam a ser denominadas mioblastos ativados. Estes mioblastos vão dar origem a miotubos que produzirão filamentos grossos e finos para, mais tarde, originar uma fibra muscular madura. Caso haja perda de integridade da lâmina basal, os miotubos têm a capacidade de formar ligações até quatro milímetros. Contudo, em lesões de maior extensão terá de haver formação de tecido fibroso. Nestes casos, mesmo que as células satélites estejam disponíveis, as tentativas de regeneração vão ser ineficazes (McGavin & Valentine, 2009). Tendo em conta o que foi mencionado anteriormente, conclui-se que afeições como miopatias metabólicas, nutritivas e tóxicas têm elevada capacidade regenerativa, pois a lâmina basal mantém a sua integridade. Já no caso das distrofias primárias há uma boa capacidade de regeneração mas, como as células musculares voltam a degenerar, podem, eventualmente, surgir zonas residuais de fibrose. Quanto às lesões isquémicas, estas vão regenerar pouco, ou mesmo nada, porque as células satélite e as células do endomísio podem estar danificadas e, portanto, haverá formação de tecido conjuntivo fibroso. A fibrose pode ser dominante em lesões de miosite ou lesões físicas já cicatrizadas (Vleet & Valentine, 2007).

2.3. Alterações da Dimensão das Fibras Musculares

2.3.1. Atrofia

A atrofia muscular refere-se a uma redução no volume de músculo, que geralmente reflete uma diminuição no diâmetro das fibras musculares. A atrofia pode envolver todas as fibras uniformemente ou afetar somente um tipo de fibras musculares. Costuma ser necessária a avaliação histoquímica para determinar claramente o tipo de atrofia presente (Vleet & Valentine, 2007). Numa fase inicial, em que a observação macroscópica não permite identificar a perda de massa muscular, pode ser necessário efetuar a avaliação morfométrica do diâmetro das fibras musculares.

Relativamente às causas de atrofia das fibras musculares estas incluem processos fisiológicos, metabólicos e de falta de inervação (McGavin & Valentine, 2009). Quando um músculo não é

utilizado por um determinado período de tempo há diminuição da sua atividade contrátil mantendo-se, contudo, a inervação do mesmo (Vleet & Valentine, 2007). Esta atrofia é uma resposta fisiológica por falta de uso (atrofia por desuso). Neste tipo de atrofia, as fibras do tipo II são preferencialmente afetadas e o grau de atrofia é inferior ao causado por caquexia ou desinervação e, frequentemente, assimétrico. A atrofia muscular fisiológica também ocorre devido ao envelhecimento ou à caquexia (McGavin & Valentine, 2009). A atrofia por caquexia e má nutrição ocorre quando um animal é incapaz de fornecer ao tecido muscular nutrientes suficientes para o manter e as proteínas musculares tornam-se uma fonte de energia para o resto do organismo (Vleet & Valentine, 2007). A ausência de inervação de um determinado músculo, também denominada por atrofia neurogénica, ocorre quando as fibras musculares perdem ligação com o nervo periférico devido a neuropatia ou neuronopatia (Reece, 2005; Vleet & Valentine, 2007). Este tipo de atrofia ocorre geralmente de forma rápida e grave, sendo que mais de metade da massa muscular de um músculo totalmente desinnervado pode ser perdida em apenas uma semana. Apesar das fibras musculares desaparecerem rapidamente, o mesmo não ocorre aos núcleos das fibras musculares. Assim, nas atrofias neurogénicas há um aumento notável da concentração de mionúcleos com concomitante atrofia de todas as fibras musculares innervadas pelo nervo afetado. Como as unidades motoras estão misturadas em padrão mosaico, as fibras musculares desinnervadas vão estar dispersas por vários cortes de tecido muscular. Geralmente, neste tipo de atrofia, ambas as fibras musculares dos tipos I e II são afetadas, sendo importante a realização do exame histológico. Quando o músculo ainda pode ser utilizado, é comum as fibras musculares innervadas hipertrofiarem por causa do aumento da carga de trabalho. Estas fibras, no caso de desinervações crónicas, costumam ser do tipo I (McGavin & Valentine, 2009). Um padrão com fibras de elevado diâmetro misturado com fibras atrofiadas é característico nos casos de desinervação crónica e grave. Quando as fibras são novamente reinervadas retornam ao diâmetro normal e transformam-se no tipo de fibra, determinado pelo neurónio que as passou a innervar. Desta forma, o típico arranjo em mosaico das fibras musculares tipo I e II é perdido e formam-se grupos do mesmo tipo de fibra adjacentes umas às outras, processo denominado agrupamento por tipo de fibra (Vleet & Valentine, 2007). É importante não confundir este fenómeno com conversões de fibras (mais frequentemente nas fibras do tipo I) que ocorre em miopatias crónicas. Para isso, é fulcral avaliar a estrutura e a função do sistema nervoso periférico (McGavin & Valentine, 2009).

As doenças endócrinas, como, por exemplo, o hipotireoidismo e o hipoadrenocorticism no cão, também podem levar à atrofia muscular. Em ambas, é possível observar a atrofia seletiva das fibras musculares do tipo II sem hipertrofia compensatória das fibras do tipo I (Vleet & Valentine, 2007). Por fim, existem também atrofias miopáticas que costumam exibir atrofia seletiva do tipo I, principalmente, no caso de miopatias congénitas e na miopatia nemalínica felina. As miopatias crónicas costumam também envolver hipertrofia das fibras musculares (McGavin & Valentine, 2009; Vleet & Valentine, 2007).

2.3.2. Hipertrofia

Tanto o aumento do tamanho individual de uma fibra muscular, como o aumento do tamanho do músculo como um todo são processos denominados por hipertrofia (Reece, 2005), sendo que a hipertrofia fisiológica ocorre quando há um aumento das fibras musculares após a prática de exercício físico. Este processo ocorre através da introdução de novos sarcômeros, acrescento de miofilamentos na periferia das miofibrilhas e pela adição de novas miofibrilhas (Vleet & Valentine, 2007).

Já a hipertrofia compensatória surge em circunstância patológicas, representando uma resposta inespecífica a agressões. Esta pode ocorrer quando diminui o número de fibras musculares funcionais como, por exemplo, no caso da atrofia neurogénica ou então quando há interferência no metabolismo celular normal das fibras musculares (McGavin & Valentine, 2009). Geralmente as fibras musculares encontram-se fracas ou disfuncionais devido a afeções miopáticas ou neuropáticas. Doenças como a miopatia miotónica e a distrofia muscular de Duchenne ligada ao cromossoma X no gato e, em menor grau, no cão apresentam fibras musculares hipertrofiadas. Como as fibras musculares hipertrofiadas têm menor difusão de oxigénio, têm maior probabilidade de se danificar. Por outro lado, a sobrecarga mecânica a que estão sujeitas pode levar à necrose segmentar, ou mesmo à separação da fibra em vários fragmentos de pequeno diâmetro dentro da mesma lâmina basal, fenómeno conhecido por *splitting* (Vleet & Valentine, 2007).

2.4. Alterações citomorfológicas das fibras musculares

Os componentes estruturais de uma célula muscular podem sofrer alterações consoante a miopatia presente. Essas transformações são denominadas por alterações citomorfológicas (Vleet & Valentine, 2007). Enquanto algumas são degenerativas mas não culminam em necrose, outras representam alterações ultraestruturais que podem ser fisiológicas (compensatórias) ou patológicas (McGavin & Valentine, 2009).

Alterações a nível vacuolar podem ocorrer previamente à necrose, refletir a dilatação dos sarcotúbulos, representar uma acumulação anormal de hidratos de carbono ou lípidos ou, ainda, indicar a presença de uma anomalia das fibras musculares. Já a presença de um ou mais *núcleos internos* nas células musculares, quando superior a 1%, pode indicar um processo regenerativo, associado a um aumento do *turnover* metabólico. Caso as fibras musculares estejam normais ou hipertrofiadas então, este achado é indicativo de uma alteração miopática crónica (Braund et al., 1982; McGavin & Valentine, 2009). Outra mudança relevante da citomorfologia do tecido muscular é a presença de fibras espiraladas e circulares. As primeiras apresentam o citoplasma em forma de espiral com núcleos internos, e estão presentes não só, em áreas de desinervação crónica, mas também em zonas de necrose com regeneração incompleta. Já as fibras circulares apresentam sarcômeros numa orientação perpendicular podendo, em corte transversal, observar-se estriações radiais periféricas. Este tipo de fibras visualiza-se facilmente em cortes corados com o ácido

periódico-Schiff (PAS) e podem surgir em várias doenças miopáticas e neuropáticas (McGavin & Valentine, 2009).

Outras alterações citomorfológicas como os bastonetes de nemalina podem ser observados em miopatias de gatos e, ocasionalmente, de cães. Estes bastões representam a acumulação de material na banda Z que pode ser confirmada através de microscopia eletrónica. Há também a presença de fibras em forma de alvo, que mostram zonas centrais com miofibrilhas danificadas, e as fibras vermelhas rasgadas, que podem ser observadas em doenças musculares miotónicas do cão (Vleet & Valentine, 2007). As fibras vermelhas rasgadas mostram agregados periféricos de mitocôndrias que podem ser visualizados, histoquimicamente, através das colorações NADH-TR e tricómio de Gomori modificado (McGavin & Valentine, 2009). Por fim, as acumulações anormais de glicogénio também podem ser encontradas nos músculos de cães e gatos (Vleet & Valentine, 2007).

3. Alterações *post mortem* do tecido muscular

A avaliação histológica tem um papel importante no exame *post mortem* para determinar a causa da morte do animal e o mecanismo de lesão que ocorreu. Contudo, os processos autolíticos que surgem no período *post mortem* podem alterar a interpretação da mesma. A velocidade de aparecimento destes processos está dependente de vários fatores, nomeadamente, da temperatura, da humidade do ar e do tipo de ambiente (Janssen, 1984).

Adicionalmente, as alterações *post mortem* que surgem ao nível do tecido muscular são comuns mas variáveis, tornando difícil a interpretação de alterações macroscópicas. Num animal bem nutrido cuja morte ocorra repentinamente, os músculos podem-se tornar muito pálidos. Esta palidez é causada pela acumulação de ácido láctico no músculo isquémico, e pode surgir também em animais que estão anémicos por perda de sangue, ou por falta de cobre ou ferro, sendo normal em neonatos. Já em animais malnutridos ou vítimas de doença crónica, cujas reservas de glicogénio foram gastas *ante mortem*, o músculo adquire uma tonalidade mais escura que o normal. Quando a cor do tecido muscular é vermelho escuro pode ser indicativo de rabdomiólise *ante mortem* ou putrefação (Vleet & Valentine, 2007).

O *rigor mortis* ou rigidez cadavérica é a primeira e a principal alteração que ocorre num cadáver. Desenvolve-se durante um período variável após a morte do animal e sucede ao estado de flacidez muscular primária (Gordon, Shapiro, & Berson, 1988). O fenómeno caracteriza-se pela contração dos músculos esqueléticos voluntários e involuntários, do músculo liso dos órgãos internos e dos músculos da íris (Collins & Huey, 2015; Gordon et al., 1988). Fatores como a elevada temperatura ambiente, a fadiga, a exaustão *ante mortem*, a idade, o nível de desenvolvimento muscular, o pH do tecido muscular, as reservas de glicogénio, a localização anatómica do músculo, a espécie e o género têm a capacidade de influenciar o início e a duração do *rigor mortis* (Bendall, 1960; Gordon et al., 1988; Vleet & Valentine, 2007). Para além destes fatores, o estado fisiológico do animal também vai causar variações no desenvolvimento da rigidez cadavérica em indivíduos da mesma

espécie. Animais caquéticos ou cronicamente debilitados vão apresentar um *rigor* ligeiro ou mesmo ausente, e este vai ser muito rápido em animais que morrem durante, ou logo após a realização de atividade muscular intensa (Vleet & Valentine, 2007). Por fim, há também uma variação individual de cada músculo relacionada com os níveis iniciais de fosfocreatina e ATP, pois o *rigor mortis* só ocorre quando a degradação do ATP é superior à sua síntese (Gordon et al., 1988; Vleet & Valentine, 2007). A rigidez cadavérica tem início nos músculos da cabeça, pescoço, tórax e membros torácicos, e progride no sentido caudal até aos membros posteriores e cauda. Geralmente o *rigor mortis* tem início 2 a 4 horas após a morte do animal e atinge o seu pico às 24-48h pós-morte, período após o qual tem início o seu desaparecimento no mesmo sentido da formação (Abdou, 2001).

O tecido muscular esquelético é também propenso ao aparecimento de *artefactos* que interferem com o exame histológico. Quando uma amostra de músculo é recolhida de cadáveres frescos, este ainda possui capacidade contrátil pois o corte das extremidades das fibras musculares, permite que o fluido extracelular, rico em cálcio, penetre na fibra muscular e despolete a contração muscular. O contato de amostras frescas de tecido muscular com formalina pode também promover a contração do mesmo, criando, desta forma, um artefacto. Para além desta questão, há também o problema de haver uma perda rápida de glicogénio *post mortem* que irá dificultar o diagnóstico de miopatias por armazenamento de glicogénio. Por outro lado, alterações a nível mitocondrial e de outros organelos vai interferir na avaliação ultraestrutural. As técnicas histoquímicas são também afetadas pela autólise que ocorre *post mortem*, resultando na perda de capacidade para tipificar as fibras musculares. Para minimizar a criação de artefactos deve ser utilizada uma pinça específica para fazer a recolha de amostras de tecido muscular. Também se pode recolher uma tira longitudinal de músculo que tenha cerca de 2-3 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro e fixá-la com alfinetes numa superfície rígida (Vleet & Valentine, 2007).

4. Métodos para diagnóstico de doenças musculares

Para ser possível determinar a causa que terá despoletado alterações no tecido muscular é importante fazer uma avaliação cuidadosa, não só da história e dos sinais clínicos, bem como das alterações clinico-patológicas e histopatológicas (Vleet & Valentine, 2007).

4.1. Sinais clínicos

Animais que sejam afetados por alguma doença muscular costumam manifestar fraqueza generalizada, intolerância ao exercício e uma marcha caracterizada por movimentos rígidos e/ou “saltos de coelho”. Inicialmente estes sinais são mais pronunciados nos membros pélvicos, podendo generalizar-se, dependendo da afeção presente (Cerdeira-Gonzalez, 2010).

Quando é efetuado um exame neurológico completo, os animais com doenças musculares costumam apresentar reações posturais normais, não estão atáxicos e, geralmente, os reflexos

espinhais não estão alterados (Taylor, 2008). Os reflexos miotônicos, particularmente o reflexo patelar, estão preservados, exceto em determinadas miopatias. Também o estado mental e a capacidade sensitiva estão geralmente preservados nestes animais (Cerde-Gonzalez, 2010).

Como já foi referido, as doenças musculares podem ser responsáveis por alterações do tamanho do músculo afetado e estas podem ser prontamente detetadas aquando do exame físico. A atrofia unilateral é diagnosticada mais facilmente quando o músculo atrofiado é comparado com o contralateral (McGavin & Valentine, 2009). Por outro lado, certas doenças podem causar dor e/ou inchaço muscular (Taylor, 2008). A dor muscular resulta, frequentemente, da rotura física das células musculares ou de contrações musculares prolongadas (Kaneko et al., 2008).

Em alguns indivíduos, a fraqueza de músculos da língua, da faringe, da laringe e do esófago pode resultar em sialorreia, disfagia, disfonia ou regurgitação (Cerde-Gonzalez, 2010; Shelton, 2006). Na espécie canina, o tecido muscular do esófago é totalmente do tipo esquelético e, portanto, alterações nas junções neuromusculares podem condicionar esse músculo, causando disfunção esofágica e megaesófago (McGavin & Valentine, 2009).

Por fim, um animal pode apresentar pirexia se possuir uma miopatia inflamatória ou, se concomitantemente estiver associado uma pneumonia por aspiração, resultante de megaesófago (Shelton, 2006).

4.2. Alterações clínico-patológicas

Os testes hematológicos standardizados e um painel de análises bioquímicas clínicas são as provas aconselhadas para verificar o estado de saúde do animal, permitindo detetar alterações metabólicas, ou doenças infecciosas ou que envolvam o sistema imunitário (Kaneko et al., 2008). Contudo, os testes diagnósticos específicos são críticos na diferenciação das miopatias relativamente a outras causas de doença neuromuscular (Cerde-Gonzalez, 2010).

O doseamento da atividade da enzima creatina cinase (CK) é utilizado como marcador específico de lesão das fibras musculares e é um dos parâmetros mais usados para o diagnóstico de doenças musculares (Shelton, 2010). O aumento da atividade da CK é mais relevante quando estão presentes miopatias necrosantes, inflamatórias e distróficas e, em regra, encontra-se normal em doenças musculares sem componente inflamatório (Kaneko et al., 2008). No entanto, a especificidade desta enzima é baixa devido ao elevado número de causas que podem provocar lesões musculares e também pelo facto do tempo de semivida da CK circulante ronda apenas as 6-12 horas (McGavin & Valentine, 2009; Shelton, 2010). A magnitude e a persistência dos níveis elevados da CK são indicativos da extensão das lesões musculares (Shelton, 2010), devendo ser tido em atenção que também podem estar aumentados em casos de decúbito prolongado, injeções traumáticas, cirurgia, pirexia, enfarte cardíaco, ou após a realização de uma eletromiografia (Cerde-Gonzalez, 2010). Em suma, a atividade da CK circulante deve ser medida sempre que a suspeita de doença muscular está presente, principalmente em cães jovens, porque o aumento da sua

atividade pode ser um indicador precoce de doença muscular. Porém, a atividade da CK nem sempre está aumentada quando está presente uma doença muscular pelo que esta não deve ser excluída dos diagnósticos diferenciais apenas com base nos níveis normais da CK (Shelton, 2010). Outras enzimas que também têm sido usadas como auxiliares no diagnóstico de doenças musculares são a aspartato transaminase (AST) e a lactato desidrogenase (LDH) séricas (McGavin & Valentine, 2009). O aumento da atividade da AST tem sido verificada em várias doenças musculares caracterizadas por necrose das fibras musculares. O tempo de semi-vida desta enzima no soro é muito mais prolongado do que o da CK e, pode permanecer elevada durante semanas após a ocorrência da lesão muscular. Contudo, a AST não é específica do tecido muscular esquelético, pois também se encontra em elevadas concentrações no tecido muscular cardíaco, no fígado e noutros órgãos, tecidos e células, nomeadamente, nos eritrócitos (Kaneko et al., 2008; McGavin & Valentine, 2009). Já a LDH também pode ser encontrada em vários tecidos do organismo, o que faz dela uma enzima não específica de um órgão ou tecido. A sua atividade aumenta não só em várias doenças musculares caracterizadas por mionecrose, mas também numa variedade de afeções hepáticas (Kaneko et al., 2008). Tal como a AST, também a LDH tem um tempo de semi-vida que dura vários dias (McGavin & Valentine, 2009).

Os níveis de lactato, piruvato e carnitina podem também encontrar-se elevados num animal em repouso ou, após exercício, particularmente em casos de miopatias mitocondriais ou de armazenamento lipídico (Cerdeira-Gonzalez, 2010). O aumento das concentrações de lactato e/ou piruvato no plasma pode ser fisiológico, resultar de patologia sistémica, como a hipóxia, a hipotensão, o choque séptico ou a insuficiência renal, e ainda de doenças metabólicas como a acidose. Contudo, estes indicadores séricos não são avaliados por rotina devido à sua inespecificidade e à dificuldade no manuseamento, processamento e recolha das amostras de sangue, que tornam os resultados obtidos pouco fidedignos (Shelton, 2010).

Para concluir, é importante referir que não é necessário que haja mionecrose para que a fibra muscular perca a sua funcionalidade. Doenças miopáticas e neuropáticas que resultem em atrofia, fraqueza, espasmo, miotonia ou aumento da rigidez muscular raramente levam ao aumento da concentração sérica das enzimas musculares. Atualmente não se encontra disponível nenhum parâmetro bioquímico que permita avaliar a função da fibra muscular. (McGavin & Valentine, 2009).

4.3. Eletromiografia

O tecido muscular tem a capacidade de gerar correntes elétricas quando é estimulado. Pequenas alterações de voltagem são produzidas quando estas correntes atravessam a resistência gerada pelos tecidos e pelo meio salino do organismo. A técnica que capta estes pequenos sinais é denominada por eletromiografia (EMG) e os sinais designam-se por eletromiogramas (Whelan, 2003). Desta forma, a EMG permite realizar o estudo da atividade elétrica insercional (atividade elétrica detetada pelo eletrodo enquanto atravessa a fibra muscular), espontânea e voluntária do

tecido muscular. No músculo normal, a atividade insercional deve ter um início e um fim abrupto, durando centenas de milissegundos, sem sofrer variações de intensidade. Esta atividade pode ser utilizada para determinar a excitabilidade do tecido muscular e, com base nos valores obtidos, avaliar o grau de fibrose, desinervação e miosite (Cuddon, 2010).

Contudo, especialmente em animais com uma taxa metabólica elevada, a lesão provocada ao tecido muscular pela inserção dos elétrodos, a longa duração deste procedimento tecnicamente exigente e a administração de anestesia geral pode trazer sérios problemas para o sucesso e realização por rotina de eletromiografias em Medicina Veterinária (Nuijens, 1997).

Ainda assim, quando a EMG é efetuada em animais de companhia, os elétrodos mais comumente usados são os de agulha concêntrica ou os que recorrem ao uso de duas agulhas monopolares. Enquanto os elétrodos concêntricos detetam menos ruído de fundo e são mais estáveis eletricamente, do que os monopolares, estas últimas acabam por causar menor dano tecidual, tornando-se menos dolorosas (Cuddon, 2010). Os elétrodos de agulha concêntrica procuram a atividade espontânea anormal gerada pelas fibras musculares. Desta forma, em tecido muscular saudável, gera-se uma linha reta a partir do músculo descontraído (McGavin & Valentine, 2009).

Quando há atividade espontânea anormal podem surgir ondas agudas positivas, fibrilação, descargas complexas repetitivas (fasciculações) e potenciais miotónicos (Cuddon, 2010; McGavin & Valentine, 2009). Relativamente às ondas agudas positivas e à fibrilação (ondas bifásicas ou trifásicas) estas formam-se quando há destabilização da membrana sarcoplasmática, o que é observado em casos de ausência de inervação e nas miopatias inflamatórias ou degenerativas (distrofia muscular) (Cuddon, 2010). A atividade espontânea que surge em miopatias degenerativas poderá estar relacionada com distúrbios iónicos, promovidos por episódios de regeneração e degeneração da fibra muscular, ou então pela facto da necrose segmentar da junção neuromuscular levar à sua desinervação (McGavin & Valentine, 2009). Já a fasciculação, que corresponde a um conjunto uniforme de ondas polifásicas, está geralmente associada a casos de desinervação crónica ou a certas doenças musculares, como miopatias associadas ao hiperadrenocorticismismo. Por fim, os potenciais miotónicos são descargas elétricas repetitivas de intensidade variável, que derivam da lesão individual das fibras musculares (Cuddon, 2010). Estes potenciais são característicos de miotonias congénitas e resultam de fluxos iónicos anormais (Cuddon, 2010; McGavin & Valentine, 2009).

4.4. Biópsia muscular

A biópsia de tecido muscular permite avaliar a integridade das fibras musculares, das junções neuromusculares, dos nervos intramusculares e do tecido conjuntivo e vasos sanguíneos em várias doenças musculares (Kaneko et al., 2008).

A seleção do músculo para a recolha da biópsia deve ter em conta vários critérios:

1. O músculo deve ser facilmente identificado cirurgicamente e possuir fibras orientadas numa única direção (Dickinson & LeCouteur, 2010). Isto porque amostras que resultem de seções com fibras musculares orientadas obliquamente são difíceis de avaliar (McGavin & Valentine, 2009);
2. O músculo escolhido não deve apresentar lesões demasiado extensas, em que exista a perda total de fibras musculares e fibrose, mas deve estar afetado pela doença. A escolha deve ser baseada nos resultados da EMG e nas alterações clínicas que sugerem envolvimento muscular (Dickinson & LeCouteur, 2010; Shelton, 2010);
3. As amostras devem ser colhidas de músculos bem estudados e cujo comportamento histológico seja bem conhecido. Geralmente são recolhidas biópsias do tríceps braquial, do vasto lateral, do tibial cranial e dos músculos temporais;
4. O local de eleição para a biópsia deve ser afastado das inserções tendíneas e das aponevroses;
5. As amostras devem estar livres de artefactos causados por doença prévia, por injeções intramusculares e pela inserção das agulhas de eletromiografia;
6. Para o diagnóstico de algumas doenças pode ser necessário a recolha de amostras de músculos específicos ou de regiões musculares em particular, como ocorre no caso da miosite dos músculos mastigadores nos cães (Dickinson & LeCouteur, 2010).

As biópsias musculares devem ser recolhidas por cirurgia aberta, permitindo a visualização da orientação das fibras musculares (Shelton, 2010). Geralmente o animal é submetido a anestesia geral após ter realizado exame de eletrodiagnóstico e provas de coagulação. Depois são recolhidas duas amostras, a primeira para fixação e a segunda para congelação e coloração histoquímica. As incisões para a recolha das amostras devem ser feitas paralelas à direção das fibras musculares. A realização de biópsias por agulha percutânea ou com o auxílio de um *punch* devem ser evitadas, devido ao tamanho limitado da amostra obtida e falta de orientação das fibras (Dickinson & LeCouteur, 2010).

Idealmente, as biópsias recolhidas para a realização de cortes de congelação devem ser congeladas o mais rapidamente possível. Contudo, pode ser necessário o transporte para laboratórios especializados (Dubowitz, Sewry, & Oldfors, 2013). Neste caso, as amostras devem ser mantidas refrigeradas e colocadas em tubos de plástico hermético para evitar a sua dissecação. O tecido muscular não deve ser imerso em soluções salinas, de fixação ou outros líquidos. Para o transporte deve-se recorrer ao uso de uma almofada isotérmica arrefecida a 4 °C e uma pequena caixa de esferovite. É importante que as amostras cheguem ao laboratório até 30 horas após a recolha (Dickinson & LeCouteur, 2010).

4.4.1. Processamento das amostras de tecido muscular

A maioria dos estudos histológicos, histoquímicos e imunohistoquímicos são realizados em amostras congeladas de tecido muscular. A congelação não pode ser efetuada diretamente em azoto líquido, pois algum deste azoto muda para o estado gasoso, acabando por envolver a amostra e retardando o processo de congelação. Para evitar tal situação, as amostras são congeladas em isopentano, que é arrefecido com azoto líquido a $-160\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tal permite uma congelação mais rápida e uma melhor preservação das estruturas (Dubowitz et al., 2013). Previamente ao processo de congelação, as amostras têm de ser fixadas em discos de cortiça com auxílio do meio de montagem OCT (Figura 3). As fibras musculares devem ficar orientadas na vertical em relação à cortiça e congeladas em isopentano durante cerca de 20 segundos. Os blocos congelados podem ser armazenados em recipientes herméticos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou em azoto líquido (Dickinson & LeCouteur, 2010).



Figura 3 - Fixação de uma amostra de tecido muscular num disco de cortiça, com auxílio do meio de montagem OCT (Dubowitz et al., 2013).

Depois de se terem obtido os blocos de tecido muscular congelado, segue-se a obtenção de *cortes de congelação* com auxílio de um crióstato a $-23/-25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para a realização de técnicas histoquímicas os cortes devem apresentar espessura entre 8 a 10 μm , enquanto para imunohistoquímica espessuras entre 5 e 7 μm são suficientes. Caso os cortes sejam demasiado espessos, podem descolar-se da lâmina nos procedimentos que se seguirão. Por outro lado, como as amostras são armazenadas a baixas temperaturas, é necessário que lhes seja dado tempo suficiente para que a sua temperatura se equilibre com a do crióstato antes do corte ser efetuado, de modo a evitar fragmentação do tecido muscular. Depois de obtidos os cortes em lâminas ou lamelas, estes podem ser envoltos em papel de alumínio e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até que sejam efetuadas as técnicas histológicas, histoquímicas e/ou imunohistoquímicas (Dubowitz et al., 2013).

Na altura de proceder à avaliação das amostras, é essencial preparar tanto cortes transversais como longitudinais. Os cortes transversais são necessárias para avaliar o diâmetro das fibras e a presença de núcleos internos. Por outro lado, são também utilizados para a deteção de várias alterações citomorfológicas. Já os cortes longitudinais são frequentemente usados não só para confirmar a presença de mionecrose aguda e regeneração, como também para determinar o comprimento do segmento envolvido. Os nervos intramusculares são também mais fáceis de identificar e de avaliar em cortes longitudinais (Vleet & Valentine, 2007).

4.4.2. Técnicas histoquímicas

O exame histoquímico do tecido muscular esquelético permite obter informações sobre as propriedades morfológicas, bioquímicas e metabólicas das fibras musculares (Kaneko et al., 2008). Desta forma, as biópsias musculares são avaliadas aprofundadamente recorrendo a cortes de congelação e a um painel standardizado de reações, permitindo a tipificação das fibras musculares (Shelton, 2010). Além disso, a utilização de técnicas histoquímicas é essencial porque permitem não só, detetar a ausência de determinada enzima, como também o excesso de um substrato em particular. As alterações estruturais que não são visíveis pelas colorações histológicas de rotina, tal como a distribuição anormal de mitocôndrias ou a deficiência enzimática na doença por *central core*, podem ser diagnosticadas recorrendo a técnicas histoquímicas (Paciello & Papparella, 2009).

As principais colorações histoquímicas utilizadas em cortes de congelação de músculo são a miosina ATPase para a tipificação de fibras; o tricrómio de Gomori modificado, a NADH-TR, a SDH e a citocromo oxidase (COX) para a identificação de alterações mitocondriais; o PAS para o glicogénio; o *Oil-red-O* para a identificação de lípidos e a fosfatase ácida para produtos armazenados no lisossoma (Kaneko et al., 2008; McGavin & Valentine, 2009). As colorações histoquímicas mais utilizadas estão enunciadas na Tabela 1, juntamente com as principais aplicações de cada uma. É importante salientar que as colorações histológicas, como a hematoxilina e eosina (H&E), também permitem detetar alterações morfológicas, nomeadamente, do tamanho das fibras musculares, do posicionamento dos mionúcleos, a localização dos vasos sanguíneos e dos nervos e a presença de fibrose ou inflamação (Paciello & Papparella, 2009).

Imediatamente após a recolha da biópsia, um conjunto de alterações degradativas e sequenciais toma lugar, incluindo a perda de atividade enzimática, sendo que a fiabilidade das técnicas histoquímicas depende da extensão das alterações ocorridas (Dubowitz et al., 2013). A alteração morfológica mais evidente é o aumento do espaço intracelular que surge após 6 a 12 horas de armazenamento das amostras a 0 °C. Há também aumento de turgidez muscular que, nas amostras de músculo canino, aparece 6 a 12 horas pós-biópsia. Por outro lado, a tipificação das fibras musculares pode ser realizada de forma fiável até 30 horas após a recolha da amostra de músculo, usando a técnica da ATPase com pré-incubação ácida e, até 18 horas, quando se trata da técnica com pré-incubação alcalina (Braund & Amling, 1988). Assim, a principal desvantagem destas

técnicas histoquímicas é a necessidade de se enviar rápida e corretamente as amostras para um laboratório especializado de forma a efetuar o processamento das mesmas. Qualquer atraso no envio resultará em amostras não utilizáveis para diagnóstico. Além disto, podem ocorrer falhas no diagnóstico se as alterações musculares forem localizadas e não abrangidas pela recolha de amostras, pois a área de músculo avaliada é reduzida (McGavin & Valentine, 2009).

Coloração Histoquímica	Principais Aplicações
ATPase (pH 4,6 e 9,4)	Diferenciação, distribuição e envolvimento dos tipos de fibras e dos seus subtipos.
COX	Identificação de miopatias mitocondriais, do padrão das fibras musculares e daquelas que são desprovidas de atividade.
Esterase não específica	Deteção de macrófagos e de fibras não inervadas. Permite a identificação das junções neuromusculares.
Fosfatase Ácida	Encontra-se elevada em doenças de armazenamento lisossomal e miopatias vacuolares.
Fosfatase Alcalina	Os seus valores estão aumentados nos vasos sanguíneos de algumas miopatias inflamatórias.
Fosfofrutocinase	Está ausente na doença de armazenamento de glicogénio ou glicogenose tipo VII.
Fosforilase	Está ausente na doença de armazenamento de glicogénio ou glicogenose tipo V.
NADH-TR	Identificação do tipo de padrão das fibras musculares, a distribuição das mitocôndrias e a destruição das miofibrilas.
PAS	Coloração específica para o glicogénio, permitindo identificar fibras com excesso ou falta do mesmo.
SDH	Avaliação do padrão das fibras musculares e identificação de fibras com mitocôndrias anormais.
Tricrómio de Gomori modificado	Identifica mitocôndrias, colagénio e bastonetes de nemalina.

Tabela 1 - Principais colorações histoquímicas e respetivas aplicações no diagnóstico de doenças musculares (Adaptado de McGavin & Zachary, 2009; Paciello & Papparella, 2009).

Em suma, a aplicação de técnicas histoquímicas, em conjunto com os procedimentos histológicos de rotina e com um exame de microscopia eletrónica vão permitir avaliar e integrar todas as manifestações anatomopatológicas, bioquímicas e fisiológicas das doenças musculares (Kaneko et al., 2008).

4.4.3. Técnicas de imunohistoquímica

A técnica de imunohistoquímica consiste na localização de antígenos, recorrendo ao uso de anticorpos específicos, ou seja, de uma reação antígeno-anticorpo (Paciello & Papparella, 2009). Sobre o complexo antígeno-anticorpo faz-se reagir um anticorpo secundário conjugado com uma enzima que, geralmente, é a peroxidase ou a fosfatase alcalina. Através da formação de complexos peroxidase anti-peroxidase, avidina-biotina-peroxidase ou avidina-biotina fosfatase alcalina, na presença do substrato para a enzima em causa, é possível a deteção da mesma, ou seja, do anticorpo ao qual está ligada, pela sua ação sobre um cromogénio com formação de depósitos coloridos. A cor obtida depende do cromogénio usado. Os mais utilizados são o tetrahidroclorato de 3,3'-diaminobenzina (DAB) de cor castanha e o 3-amino-9-etilcarbazole (AEC) de cor vermelha (Paciello & Papparella, 2009; Ramos-Vara, Avery, & Avery, 2010).

A imunohistoquímica tem um papel essencial na avaliação de biópsias musculares e permite a visualização e localização de componentes proteicos específicos do tecido muscular. Esta técnica é complementar à histológica e à histoquímica e os seus resultados devem ser interpretados em conjunto com outros estudos morfológicos e do quadro clínico geral do paciente (Dubowitz et al., 2013). Com a correta imunomarcação podem ser identificadas: deficiências nos componentes intersticiais da célula muscular, como é caso da proteína distrofina e alterações a nível das fibras musculares, podendo ainda ser efetuada a subtipificação de infiltrados linfocitários (Kaneko et al., 2008).

Atualmente, já é possível efetuar a tipificação das fibras musculares recorrendo à marcação imunohistoquímica da miosina em amostras de músculo fixadas em formalina. Tal pode ser bastante vantajoso, visto ser essencial efetuar a tipificação das fibras musculares para uma avaliação completa do músculo. A utilização desta técnica tem maior utilidade para demonstrar qual o tipo de fibra que está preferencialmente envolvido e se há alguma alteração no padrão do tipo de fibra devido a desinervação ou reinervação (McGavin & Valentine, 2009). Contudo, a maioria das imunomarcações requer que a amostra de músculo seja preservada congelada, de modo a garantir a precisão dos resultados, visto haver apenas um número limitado de anticorpos que funciona nos cortes em parafina (Paciello & Papparella, 2009).

4.5. Microscopia eletrónica

A microscopia eletrónica (ME) é uma técnica morosa mas que pode fornecer informações úteis no diagnóstico da doença muscular. Assim sendo, é considerada boa prática ter sempre uma amostra de tecido muscular disponível para a realização desta técnica (Dubowitz et al., 2013). Várias alterações estruturais, como modificações ao nível das junções neuromusculares, deficiências mitocondriais, dilatações sarcotubulares, linhas Z anormais, inclusões citoplasmáticas, bastonetes de nemalina e alterações sarcoméricas visualizam-se mais facilmente recorrendo a esta técnica (McGavin & Valentine, 2009). A análise do tecido muscular recorrendo à ME é imprescindível para

detetar algumas destas alterações estruturais, presentes em determinadas miopatias congénitas (Shelton, 2010). Também, no caso de miopatias metabólicas, pode ser útil recorrer à ME, principalmente nas situações em que as fibras musculares aparentam ser normais no microscópio ótico (Hudgson, 1970).

Relativamente ao processamento das amostras estas devem ter aproximadamente 1 mm³, serem fixadas durante uma hora e meia a duas horas à temperatura ambiente e, de seguida, lavadas com uma solução tampão. O fixador mais frequentemente utilizado é o glutaraldeído, pois garante a melhor preservação das ultraestruturas da célula muscular. Depois de obtido um bloco de tecido muscular incluído em resina apropriada, devem ser realizados cortes com 1-2 µm de espessura, que, posteriormente, são corados durante alguns segundos em azul de toluidina. Estes cortes são imprescindíveis para a escolha das áreas a examinar. Destas são obtidos cortes com 50 a 60 nm de espessura que devem ser coradas com sais de metais pesados, usualmente, acetato de uranilo seguido de citrato de chumbo, para a obtenção de contraste ao microscópio eletrónico (Dubowitz et al., 2013).

Conclui-se então que para os resultados obtidos a nível da ME serem valorizados, é imperativo que os métodos de amostragem e de manipulação das amostras de músculo sejam efetuados corretamente, minimizando, desta forma, a contração e outros artefactos, permitindo assim que os cortes transversais e longitudinais obtidos sejam precisos (McGavin & Valentine, 2009).

5. Principais doenças musculares no cão

5.1. Miopatias congénitas e hereditárias

5.1.1. Distrofia muscular ligada ao cromossoma X

As distrofias musculares (DM) são um grupo heterogéneo de doenças musculares hereditárias degenerativas e não inflamatórias. A maioria das DM em canídeos está relacionada com a ausência da proteína citoesquelética distrofina, causada por uma mutação genética (Taylor, 2008). A proteína, normalmente presente no tecido muscular cardíaco, esquelético e liso, tem como principal função ancorar a actina citoesquelética à laminina extracelular (Nguyen, Cherel, Guigand, Goubault-Leroux, & Wyers, 2002). Esta distrofia muscular é também a mais comum na espécie humana, sendo, neste caso, denominada distrofia de Duchenne (Baltzer et al., 2007). Em ambas as espécies trata-se de uma doença recessiva ligada ao cromossoma X, afetando principalmente machos (Baroncelli et al., 2013; Nguyen et al., 2002). Apesar da distrofina ser a proteína mais frequentemente afetada, na espécie canina também estão descritas deficiências a nível da laminina α -2, dos sarcoglicanos e dos distroglicanos (Cerdeira-Gonzalez, 2010).

A distrofia ligada ao cromossoma X surge essencialmente em cães da raça Golden Retriever. Contudo, já foi descrita noutras raças, nomeadamente, Labrador Retriever, Terrier Irlandês, Samoiedo, Braco Alemão de pêlo curto, Pastor Belga, Spitz Japonês, Bretão Espanhol, Bobtail, Rottweiler, Schnauzer miniatura, Malamute do Alasca, Welsh Corgi Pembroke, Cavalier King

Charles Spaniel e, por fim, Fox Terrier de pêlo cerdoso (Baltzer et al., 2007; Shelton, 2010; Taylor, 2008). Os cães afetados demonstram fraqueza, intolerância ao exercício, marcha caracterizada por movimento rígidos e “salto de coelho” logo às 6-8 semanas de vida. Apesar da atrofia muscular predominar, a base da língua, os músculos caudais da coxa e o sartório sofrem uma hipertrofia paradoxal. Os cães também podem manifestar sialorreia, dispneia, disfagia, disfonia, regurgitação e hiporeflexia (Cerdeira-Gonzalez, 2010; Shelton & Cardinet, 1987). Esta doença degenerativa e progressiva leva a uma aumento, no soro, da atividade das enzimas CK, AST, ALT e LDH. Para além de sinais clínicos a nível do músculo esquelético, os cães podem também sofrer de cardiomiopatia, levando a insuficiência cardíaca congestiva em idades mais avançadas. É importante referir que, pelos 8 a 12 meses de vida, os sinais clínicos tendem a estabilizar e que cães de raças grandes apresentam, geralmente, sintomatologia mais exuberante do que os de raça pequena (Kaneko et al., 2008; McGavin & Valentine, 2009; Vleet & Valentine, 2007).

O diagnóstico da distrofia muscular pode ser efetuado recorrendo a cortes histológicos de biópsias musculares (Figura 4) (Shelton, 2010). Nestes, poderá ser possível observar lesões focais constituídas por aglomerados de fibras musculares que podem estar a passar por um processo de necrose, regeneração, fagocitose ou infiltração macrofágica. As fibras musculares podem encontrar-se atrofiadas ou hipertrofiadas, calcificadas e hipercontraídas, e podem apresentar o núcleo centralizado (Kaneko et al., 2008). Em cães distróficos já com alguma idade, há uma marcada variação no tamanho das fibras musculares, com núcleos internos, alterações citomorfológicas, incluindo bastonetes de nemalina, e pode ser observada uma predominância de fibras do tipo I (Vleet & Valentine, 2007). O próximo passo importante para o diagnóstico é efetuar uma coloração imunohistoquímica, juntamente com a técnica de Western blotting, de forma a verificar que a proteína distrofina se encontra ausente. A utilização de anticorpos contra a distrofina revelará a sua completa ausência a nível do citoesqueleto da fibra muscular em biópsias de músculo congelado (Paciello & Papparella, 2009; Shelton, 2010; Vleet & Valentine, 2007).

Infelizmente, ainda não se encontra disponível um tratamento definitivo para esta doença (McGavin & Valentine, 2009), sendo o prognóstico reservado. Por outro lado, a prednisolona, associada ou não à ciclosporina, não parece ser eficaz em Golden Retrievers com distrofia muscular. Como o avanço clínico da doença abranda a partir dos 6 meses de idade, pacientes com sinais clínicos menos exuberantes têm um melhor prognóstico (Cerdeira-Gonzalez, 2010).

5.1.2. Miopatia centronuclear do Labrador Retriever

A miopatia centronuclear representa um grupo de doenças que apresentam uma grande percentagem de pequenas fibras musculares de núcleo central (Pierson, Tomczak, Agrawal, Moghadaszadeh, & Beggs, 2005). Esta miopatia hereditária tem sido descrita em cães da raça Labrador Retriever de vários continentes, nomeadamente, Europa, América do Norte e Austrália. A doença é considerada autossómica e recessiva, surgindo em cães de trabalho e de desporto. Tanto

Labradores de pêlo amarelo, como de pêlo preto podem ser afetados (McGavin & Valentine, 2009; Vleet & Valentine, 2007).

Os cachorros afetados aparentam ser normais ao nascimento. Contudo, por volta dos 3 a 5 meses de idade, começam a demonstrar fraqueza muscular, intolerância ao exercício e atrofia muscular sem mialgia associada (Taylor, 2008). A marcha apresenta uma passada curta com “salto de coelho” e os animais deslocam-se cabisbaixos e em cifose. A atrofia é proeminente nos músculos apendiculares, cervicais e mastigadores. Os cães afetados também costumam manifestar hiperextensão do carpo, hiporeflexia patelar e afastamento dos dígitos (Cerdeira-Gonzalez, 2010). Os sinais clínicos podem exacerbar-se com o *stress*, a realização de exercício físico, excitação ou com uma temperatura ambiente baixa e a sua gravidade é variável entre indivíduos da mesma ninhada (Taylor, 2008). A doença pode progredir mas, geralmente, estabiliza entre os 6 meses e o ano de idade, podendo demonstrar melhorias com o passar do tempo (Vleet & Valentine, 2007). As concentrações séricas de CK e de AST encontram-se frequentemente normais ou ligeiramente aumentadas (Taylor, 2008).

O diagnóstico pode ser efetuado com base nos sinais clínicos e na avaliação de amostras de músculo obtidas por biópsia (Shelton, 2007). No exame histológico, os músculos afetados demonstram marcada variação no tamanho das fibras musculares, que é mais evidente em cães mais velhos (Vleet & Valentine, 2007). Desta forma surgem algumas fibras atrofiadas, outras hipertrofiadas e várias com núcleos centralizados. Também podem ser observados agregados mitocondriais periféricos anormais e há frequentemente uma predominância de fibras musculares tipo I. Por outro lado, formam-se agrupamentos por tipo de fibra, embora alterações neuropáticas não estejam presentes (McGavin & Valentine, 2009). Recentemente, foi descoberta qual a mutação genética que está por detrás desta doença e um teste de ADN já está comercialmente disponível em alguns países (Taylor, 2008).

Atualmente, não se encontra disponível nenhum tratamento específico para esta doença (Shelton, 2007). No entanto, a suplementação com L-carnitina (50 mg/Kg BID) e minimizar a exposição do animal ao *stress* e ao frio pode promover a melhoria dos sinais clínicos. O prognóstico é bom a razoável, pois a miopatia centronuclear geralmente estabiliza até ao ano de idade (Cerdeira-Gonzalez, 2010).

5.1.3. Miopatia do Boiadeiro de Flandres

A miopatia do Boiadeiro de Flandres é uma polimiopatia degenerativa rara, observada em cães até aos 2 anos de idade (Clark, 2014). Os sinais clínicos passam por regurgitação, intolerância ao exercício, atrofia muscular generalizada e alterações da marcha. É frequente a presença de megaesófago em cães afetados e a maioria apresenta um ligeiro aumento da atividade das enzimas CK e AST no soro (Ackerman, 2011).

As principais alterações histopatológicas incluem alterações no tamanho das fibras musculares com atrofia e hipertrofia de ambos os tipos de fibras musculares. Concomitantemente, surgem alterações citomorfológicas graves, nomeadamente, *splitting* das fibras, presença de núcleos internos e fibras em espiral. Também ocorre necrose multifocal das fibras musculares e regeneração, bem como fibrose do endomísio e do perimísio, sempre de forma ligeira (Vleet & Valentine, 2007).

Apesar desta miopatia ter uma componente hereditária, a forma como é herdada ainda não foi determinada. Contudo, recomenda-se que os animais doentes não sejam utilizados como reprodutores. Por fim, é importante referir que não existem terapêuticas de sucesso, sendo que o tratamento efetuado é apenas de suporte e, infelizmente, esta doença aparenta progredir rapidamente (Ackerman, 2011).

5.1.2. Miopatia hereditária do Dogue Alemão

É uma miopatia hereditária, não inflamatória, com características histológicas distintas das outras miopatias que têm sido descritas em cães jovens da raça Dogue Alemão. Os sinais clínicos surgem antes do ano de idade e ambos os sexos são afetados (Shelton, 2007).

Os animais manifestam intolerância ao exercício, fraqueza progressiva, atrofia muscular e tremores após a prática de exercício físico ou em estação (Figura 4). Os reflexos patelares podem encontrar-se diminuídos e os níveis de CK estão aumentados (Cerdeira-Gonzalez, 2010; Chang, McCulloch, & Anderson, 2010).

A nível histológico observam-se, de forma dispersa, fibras em regeneração e em degeneração e, estruturas semelhantes a núcleos no interior das fibras musculares. Após uma avaliação das ultraestruturas destas fibras musculares conclui-se que estas formações são, na verdade, miofilamentos desorganizados e que há um espessamento das bandas Z, semelhante a bastonetes de nemalina (Vleet & Valentine, 2007).



Figura 4 - Dogue Alemão de 10 meses com miopatia hereditária (Shelton, 2007).

Não há tratamento específico disponível para esta miopatia (Shelton, 2007). Relativamente ao prognóstico este varia, sendo que, na maioria dos cães a doença avança de tal forma que, pelo ano de idade, estes têm de ser submetidos a eutanásia. Contudo, uma pequena porção dos cães doentes pode estabilizar e apresentar um melhor prognóstico a longo prazo (Cerde-Gonzalez, 2010).

5.1.3. Miopatia distal do Rottweiler

Esta miopatia hereditária, de etiologia desconhecida, manifesta-se logo nas primeiras semanas de vida em cães da raça Rottweiler (Cerde-Gonzalez, 2010). Tanto fêmeas como machos são atingidos e a doença apresenta um caráter progressivo (Vleet & Valentine, 2007).

Assim, os cães desenvolvem fraqueza distal apendicular, evidenciada por alterações posturais, que vão desde o afastamento anormal dos dígitos, à hiperflexão dos tarsos até à aquisição de uma postura plantígrada e palmígrada (Hanson, Smith, Walker, & Shelton, 1998). Relativamente a alterações clínico-patológicas é possível encontrar níveis de CK ligeiramente anormais e valores de carnitina no tecido muscular e no plasma diminuídos (Cerde-Gonzalez, 2010).

As alterações histopatológicas mais evidentes consistem em atrofia, necrose miofibrilar e substituição do tecido muscular por tecido adiposo e conjuntivo (Hanson et al., 1998). O único tratamento descrito baseia-se na suplementação com carnitina que pode promover uma melhoria dos sinais clínicos, apesar da eficácia do tratamento não estar totalmente comprovada (Cerde-Gonzalez, 2010).

5.1.4. Miotonia canina congénita

A miotonia é definida clinicamente como a incapacidade temporária das fibras musculares esqueléticas para relaxarem, induzindo uma tensão muscular descontrolada, por tempo limitado, após a ocorrência de uma contração muscular voluntária (Vleet & Valentine, 2007). Esta forma congénita é causada pela disfunção nos canais de cloro existentes no sarcolema e afeta várias raças, incluindo o Chow-chow, o Schnauzer miniatura, o Dogue Alemão, o Labrador Retriever, o Cocker Spaniel, o Leão da Rodésia, o Staffordshire Bull Terrier, o Poodle, o Samoiedo e o West Highland White Terrier (Cerde-Gonzalez, 2010; Lobetti, 2009). Contudo, esta doença está mais estudada no Chow-chow e Schnauzer miniatura e sabe-se que, nesta última, é herdada de forma autossómica recessiva (Taylor, 2008; Vleet & Valentine, 2007).

Os sinais clínicos começam a surgir por volta dos 6 meses de idade e incluem hipertonidade marcada e hipertrofia muscular, particularmente nos músculos dos membros, pescoço e língua (Cerde-Gonzalez, 2010). Os cães têm dificuldade em se levantar, apresentam marcha rígida e movimento de “salto de coelho” nos membros pélvicos (McGavin & Valentine, 2009). Pode haver igualmente envolvimento da região laríngea e faríngea, levando a disfagia, sialorreia, estridor, disfonia e aumento do risco de pneumonia por aspiração (Cerde-Gonzalez, 2010). O laringospasmo

é comum, conduzindo a episódios de colapso ou cianose (Vleet & Valentine, 2007). Todos estes sinais clínicos são exacerbados pela prática de exercício físico, pelo frio e pela excitação do próprio animal (Taylor, 2008).

Por outro lado, os valores de CK e ALT podem estar normais ou ligeiramente aumentados, indicando a presença de necrose das fibras musculares. O diagnóstico pode ser confirmado através da realização de eletromiografia que irá revelar fasciculações bizarras, de alta frequência, que crescem e decrescem (McGavin & Valentine, 2009; Taylor, 2008). A biópsia muscular pode suportar o diagnóstico mas não se recomenda a sua realização, particularmente, em animais com disfunção laríngea ou faríngea (Cerdeira-Gonzalez, 2010). As alterações histopatológicas só se observam em estadios mais avançados da doença e são constituídas pela variação excessiva do tamanho das fibras musculares, devido à hipertrofia e atrofia que ocorre a nível celular. Surgem também núcleos internos e, por vezes, ligeira fibrose do endomísio (Vleet & Valentine, 2007).

Quanto ao tratamento tem sido observado que agentes estabilizadores de membrana, nomeadamente, procaína (10 a 30 mg/kg PO q6h) e fenitoína (20 a 35 mg/kg PO q12h) têm mostrado efeito benéfico em alguns casos. Também a mexilina (8 mg/kg PO q8h), um bloqueador dos canais de sódio, tem mostrado efeitos positivos no tratamento desta doença. É igualmente importante evitar a exposição do animal ao frio (Taylor, 2008). Apesar dos sinais clínicos estabilizarem por volta dos 6 a 12 meses de idade, a maioria dos cães é submetido a eutanásia devido à gravidade do quadro clínico (Cerdeira-Gonzalez, 2010; Taylor, 2008).

5.1.5. Miopatias metabólicas primárias

As miopatias metabólicas englobam um grupo diverso de doenças causadas por defeitos bioquímicos no sistema gerador de energia do tecido muscular esquelético (Shelton, 2006). As anomalias presentes conduzem a disfunção neuromuscular e são, frequentemente, hereditárias. Contudo, podem também ocorrer devido a defeitos metabólicos adquiridos. Os defeitos metabólicos podem afetar vários sistemas orgânicos, como o músculo esquelético, o músculo cardíaco, o tecido nervoso e o fígado. No entanto, a disfunção muscular pode ser o único sinal clínico existente (Vleet & Valentine, 2007). Os cães apresentam intolerância ao exercício, rabdomiólise, câibras induzidas pelo exercício e contraturas musculares (McGavin & Valentine, 2009). Os defeitos bioquímicos afetam, principalmente, a produção de ATP (Shelton, 2006).

Em Medicina Veterinária, as miopatias metabólicas primárias identificadas podem provocar alterações do metabolismo dos hidratos de carbono, da função mitocondrial ou do metabolismo lipídico (Vleet & Valentine, 2007). A natureza altamente oxidativa do tecido muscular canino pode predispor para doenças ao nível do metabolismo oxidativo, incluindo miopatias mitocondriais e problemas com a oxidação dos ácidos gordos ou com o metabolismo da carnitina (Shelton, 2006).

5.1.5.1. Doenças de armazenamento de glicogénio

As glicogenoses ou doenças de armazenamento de glicogénio envolvem um excesso de armazenamento de glicogénio no interior das fibras musculares afetadas, resultando na presença de vacúolos contendo glicogénio (Kaneko et al., 2008). A maioria destas doenças são autossómicas recessivas (Walvoort, 1985). Na espécie canina encontram-se descritas as seguintes doenças devidas a defeitos no metabolismo do glicogénio (Shelton, 2006):

- **Glicogenose tipo II no cão Finlandês da Lapónia (Doença de Pompe):** o defeito metabólico ocorre a nível da alfa-glucosidase ácida, uma hidrolase lisossomal (Kaneko et al., 2008; Walvoort, 1985). Vários órgãos estão envolvidos, mas as alterações mais graves localizam-se no tecido muscular esquelético, cardíaco e liso (Vleet & Valentine, 2007). Os sinais clínicos predominantes são regurgitação (derivado do megaesófago), disfunção do miocárdio, fraqueza muscular progressiva que leva a exaustão e morte antes dos dois anos de idade (Walvoort, 1985). As principais lesões histopatológicas consistem no armazenamento massivo de glicogénio, visível em preparações de rotina como vacúolos. Este material cora de forma positiva na coloração PAS em cortes de congelação e é digerido pela amilase. Tal permite concluir que se trata realmente de glicogénio (Vleet & Valentine, 2007).
- **Glicogenose tipo III no Pastor Alemão e no Akita inu (Doença de Cori):** ocorre devido à deficiência numa enzima desramificadora do glicogénio (Gregory, Shelton, Bali, Chen, & Fyfe, 2007). Costuma afetar vários órgãos e o início de sinais clínicos como fraqueza muscular, letargia e hipoglicémia, ocorre por volta dos 2 meses de idade, acabando por levar à morte destes animais quando têm idades compreendidas entre os 10 e os 15 meses (Cerde-Gonzalez, 2010; Kaneko et al., 2008).
- **Glicogenose tipo IIIa no *Curly Coated Retriever*:** a atividade da enzima desramificadora do glicogénio é deficiente no fígado e no músculo esquelético (Yi et al., 2012). Os sinais clínicos são muito ligeiros ou mesmo nulos no primeiro ano de vida (Gregory et al., 2007). Contudo, as enzimas AST, ALT e CK podem apresentar valores acima do normal. Mais tarde, estes cães tornam-se letárgicos, podem sofrer episódios de colapso por hipoglicémia e apresentam um tempo de recuperação superior ao normal após a prática de exercício físico moderado (Shelton, 2007). Analisando as biópsias de fígado e de músculo esquelético é possível visualizar acumulação excessiva de glicogénio nos hepatócitos e miócitos, sem sinais de inflamação ou fibrose a nível hepático (Yi et al., 2012). Em alguns países está disponível um teste genético que recorre ao PCR para diagnosticar animais afetados e portadores (Cerde-Gonzalez, 2010; Shelton, 2007).
- **Glicogenose tipo VII no *Springer Spaniel* Inglês e no *Cocker Spaniel* Americano (doença de Tarui):** é uma doença caracterizada pela deficiência na enzima fosfofrutoquinase (PFK). Alterações qualitativas e quantitativas da atividade da PFK podem

modificar, de forma significativa, o metabolismo de eritrócitos e miócitos, que dependem do metabolismo da glucose para a obtenção de energia (Vleet & Valentine, 2007). Desta forma, os cães afetados têm uma atividade total da PKF de apenas 10% nos eritrócitos, face ao normal (Kaneko et al., 2008). Assim, os animais doentes apresentam anemia hemolítica compensada e podem desenvolver episódios de hemólise intravascular com hemoglobinúria associada (Harvey, Mays Calderwood, Gropp, & Denaro, 1990). Em cães mais velhos podem ainda surgir sinais como a intolerância ao exercício, câibras induzidas pelo exercício, atrofia muscular progressiva e fraqueza (Vleet & Valentine, 2007). A nível histopatológico, o tecido muscular alterado pode apresentar grande variação no diâmetro das fibras musculares, vacúolos no interior das mesmas e material incluso PAS-positivo (Harvey et al., 1990).

Infelizmente não há tratamento específico para nenhuma das glicogenoses mencionadas, o que confere mau prognóstico a todas estas doenças (Cerde-Gonzalez, 2010).

5.1.5.2. Miopatias mitocondriais

As miopatias mitocondriais identificadas em cães da raça Clumber Spaniel e Spaniel de Sussex derivam de uma mutação homozigótica na enzima piruvato desidrogenase fosfatase 1 (PDP 1). Em cães da raça Bobtail surge uma doença semelhante causada pela função anormal da citocromo C oxidase (Cerde-Gonzalez, 2010; Vleet & Valentine, 2007). Em ambos os casos, os cães afetados apresentam intolerância ao exercício antes do ano de idade e episódios de fraqueza muscular (Shelton, 2006; Vleet & Valentine, 2007).

Na deficiência da PDP1 pode ser efetuado um diagnóstico presuntivo, através do rácio lactato:piruvato, que permitirá verificar se os valores de lactato plasmático ou a concentração de piruvato se encontram elevados. Há também um teste genético disponível para mutações PDP1. Apesar de não existir tratamento específico disponível, modificações na dieta recorrendo a um aumento no teor de gordura, à suplementação com tiamina e L-carnitina e à redução nos hidratos de carbono, pode trazer benefícios (Cerde-Gonzalez, 2010; Shelton, 2006).

5.1.5.3. Miopatias por armazenamento lipídico

A acumulação anormal de lípidos tem sido observada nas fibras musculares do tipo I de cães com mialgia generalizada, fraqueza, tremores, claudicação e atrofia muscular (Cerde-Gonzalez, 2010; Kaneko et al., 2008). O defeito bioquímico existente nestes animais ainda não foi caracterizado mas sabe-se que a maioria apresenta acidose láctica (Shelton, 2006).

Para se efetuar o diagnóstico desta miopatia basta que se observe, ao microscópio, a existência de numerosas acumulações lipídicas de grandes dimensões, armazenadas no interior das fibras musculares (Cerde-Gonzalez, 2010). É importante ter em consideração que a presença de lípidos

no interior das fibras musculares é normal em cachorros até aos 2 meses de idade e não deve ser interpretado como uma miopatia por armazenamento de lípidos (Vleet & Valentine, 2007).

A terapia existente, apesar de não ser definitiva, pode trazer melhorias e passa pela suplementação com L-carnitina (50 mg/Kg q12h), coenzima Q10 (100 mg q24h) e riboflavina (vitamina B2) (Cerde-Gonzalez, 2010; Shelton, 2006).

5.1.5.4. Hipertermia maligna

A hipertermia maligna (HM) é uma síndrome hereditária heterozigótica e fatal despoletada, em indivíduos suscetíveis, por um *stress* químico, físico ou psíquico (Brien, Cribb, White, Olfert, & Steiss, 1983; Brien, Forsyth, Olexson, Thatte, & Addis, 1984; Vleet & Valentine, 2007).

Geralmente a inalação de anestésicos, a administração de fármacos despolarizantes neuromusculares ou, mais raramente, a prática de exercício físico são os estímulos necessários para despoletar episódios caracterizados por contrações musculares permanentes e hipertermia (Cerde-Gonzalez, 2010). É a libertação desregulada de cálcio por parte do retículo sarcoplasmático que vai promover a contração excessiva das fibras musculares e, conseqüentemente, levar a um aumento drástico da temperatura corporal (McGavin & Valentine, 2009). Por sua vez, o defeito congénito está presente no gene do recetor rianodina, um canal de cálcio, que permite a libertação de cálcio para fora do retículo sarcoplasmático (Vleet & Valentine, 2007). Estando estes recetores defeituosos e, na presença de estímulos nocivos, surge a elevação incontrolável do cálcio mioplasmático e, de seguida, a estimulação excessiva da glicogenólise e da atividade contrátil (Brien et al., 1983).

Têm sido reportados episódios de HM induzidos pela prática de exercício físico em cães da raça Labrador Retriever e Springer Spaniel Inglês. Já a ingestão de lúpulo pode despoletar episódios em Galgos (Vleet & Valentine, 2007). Em relação aos sinais clínicos, a maioria dos animais afetados desenvolve inicialmente hipercapnia, seguindo-se hipertermia, rigidez muscular e, em casos mais graves, mioglobinúria, acidose metabólica e aumento da CK (Cerde-Gonzalez, 2010).

Através de uma biópsia muscular é possível verificar que o músculo sofre alterações miopáticas crónicas que vão desde a presença de núcleos internos, variações do tamanho das fibras musculares até hipertrofia das fibras musculares e raras fibras necrosadas (McGavin & Valentine, 2009). Existem testes *in vitro* que podem confirmar o diagnóstico mas têm um custo avultado e não se encontram facilmente disponíveis (Cerde-Gonzalez, 2010).

Cães que têm antecedentes com história de HM, complicações anestésicas inexplicáveis ou um aumento sérico das enzimas musculares sem razão aparente, devem ser suspeitos de apresentarem igualmente alguma suscetibilidade. Contudo, estes animais podem ser submetidos a anestesia de forma segura, evitando agentes capazes de despoletar um episódio. Para isso, basta que os animais sejam monitorizados continuamente para o aparecimento de sinais de HM e esteja preparado dantrolene IV (5 mg/kg) (Brien et al., 1983). O dantrolene vai bloquear a libertação de

cálcio a partir do retículo sarcoplasmático e deve ser administrado até o paciente recuperar totalmente da anestesia. É igualmente importante arrefecer o animal de forma gradual, restaurar o equilíbrio ácido-base e o balanço eletrolítico, bem como, iniciar um suporte hemodinâmico com fluidoterapia IV sem cálcio. O prognóstico após a ocorrência de um episódio é reservado, dependendo da gravidade do evento (Cerde-Gonzalez, 2010).

5.2. Miopatias inflamatórias

As miopatias inflamatórias incluem doenças generalizadas como a polimiosite, a dermatomiosite e miopatias focais, como a miosite dos músculos extraoculares e a dos músculos mastigadores (Shelton, 2006). Todas elas resultam de infiltração celular inflamatória não supurativa do músculo esquelético (Evans, Levesque, & Shelton, 2004). Após se ter confirmado o diagnóstico de miopatia inflamatória, pode ser necessário realizar mais testes laboratoriais de forma a identificar a causa específica. Os testes escolhidos variam consoante a apresentação clínica e o padrão do envolvimento muscular, que pode ser focal ou generalizado (Shelton, 2010).

5.2.1. Polimiosite imunomediada

A polimiosite imunomediada em cães é uma inflamação difusa do tecido muscular esquelético causada por uma resposta autoimune contra o mesmo (Cerde-Gonzalez, 2010; Taylor, 2008). Esta doença ocorre mais frequentemente em cães adultos de várias raças, apesar de haver um maior número de casos reportados em cães de porte grande como é o caso do Pastor Alemão, do Boxer e do Terra Nova (Taylor, 2008; Vleet & Valentine, 2007). A etiologia inicial da doença é desconhecida, embora timomas, lúpus eritematoso sistémico (LES) ou o uso de fármacos como o trimetropim-sulfa, a cimetidina ou a penicilamina possam despoletar o seu aparecimento (Cerde-Gonzalez, 2010; McGavin & Valentine, 2009).

Os sinais clínicos são variáveis e incluem intolerância ao exercício, fraqueza muscular generalizada, movimentos rígidos e atrofia muscular. Pode ser evidente dor quando efetuada uma palpação muscular mais vigorosa (Vleet & Valentine, 2007). Os cães afetados podem também regurgitar devido ao megaesófago presente ou exibir disfagia, sialorreia e disfonia. Todos estes sinais podem ser intermitentes nos casos ligeiros ou no estadio inicial da doença (Taylor, 2008). Por vezes, os doentes apresentam também pirexia (Cerde-Gonzalez, 2010). Por fim, é importante referir que, pode ser mais evidente a atrofia dos músculos temporal e masséter, mimetizando a aparência de cães com miosite dos músculos mastigadores (McGavin & Valentine, 2009).

Os critérios de diagnóstico para esta doença incluem a observação dos sinais clínicos, concentrações aumentadas da CK no soro, alterações a nível da eletromiografia, testes serológicos negativos para determinadas doenças infecciosas e a confirmação histológica de infiltrados linfocíticos no músculo esquelético (Evans et al., 2004). Como já foi referido, as causas infecciosas de miosite devem ser excluídas antes de ser feito o diagnóstico de polimiosite imunomediada. Os

agentes infecciosos tais como *Neospora caninum*, *Hepatozoon americanum*, *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Rickettsia rickettsii*, *Leptospira australis* e *Leishmania infantum* podem ser visualizados também numa biópsia muscular ou usando anticorpos específicos (Shelton, 2010). Para efetuar o diagnóstico definitivo é sempre necessário a realização de biópsia muscular (Taylor, 2008). Muitas vezes é preciso avaliar múltiplas amostras de diferentes localizações para detetar as lesões inflamatórias. Os achados histopatológicos são constituídos por infiltrado linfocítico intersticial e perivascular presente no músculo afetado, sendo característica a invasão por linfócitos das fibras musculares intactas (Vleet & Valentine, 2007). É também evidente regeneração muscular e fibrose (McGavin & Valentine, 2009). É igualmente muito típico haver necrose multifocal, fagocitose de fibras musculares do tipo I e II e infiltrados plasmocíticos perivasculares (Taylor, 2008). Para finalizar, estudos de imunofenotipagem concluíram que os linfócitos invasores na polimiosite canina são células T citotóxicas (CD8+) (Shelton, 2010; Vleet & Valentine, 2007). Quanto ao tratamento é recomendada a administração de doses imunossupressoras de prednisolona (1 a 2 mg/kg q12h durante 14 dias, depois q24h durante outros 14 dias e depois q48h). Tal parece permitir a melhoria clínica dramática e a boa recuperação para a maioria dos cães (Cerde-Gonzalez, 2010; Taylor, 2008). Este tratamento deve prologar-se, no mínimo, 4 a 6 semanas em doses decrescentes. Contudo, estes animais podem exigir terapia para o resto da vida. O prognóstico é bom em cães que não apresentem megaesófago grave ou pneumonia por aspiração (McGavin & Valentine, 2009; Taylor, 2008).

5.2.2. Miosite dos músculos mastigadores (MMM)

A miosite dos músculos mastigadores é uma miopatia inflamatória focal de origem autoimune que afeta, exclusivamente, os músculos mastigadores: temporal, masséter, pterigóideos e digástricos (Cauduro et al., 2013). Estes músculos no cão são compostos, principalmente, por fibras musculares do tipo 2M. Estas são fibras de contração rápida que possuem uma isoforma de miosina única, tanto da cadeia pesada como da leve (Kaneko et al., 2008). Por outro lado, uma proporção significativa dos cães afetados por esta doença (cerca de 80%) apresenta níveis elevados de anticorpos circulantes, especificamente direcionados contra as proteínas das fibras 2M (Shelton & Cardinet, 1987; Taylor, 2008). Estes anticorpos (IgG) participam na destruição seletiva destas fibras musculares e podem ser úteis no diagnóstico desta miopatia (Melmed, Shelton, Bergman, & Barton, 2004; Taylor, 2008).

Cães de raças de grande porte e da raça Pastor Alemão mostram-se predispostos para o desenvolvimento de MMM. A maioria começa a demonstrar sinais clínicos por volta dos 3 anos de idade (Cerde-Gonzalez, 2010; Melmed et al., 2004). Na fase aguda, os cães evidenciam mialgia localizada, trismo (incapacidade em abrir a boca), edema e inchaço dos músculos mastigadores (Melmed et al., 2004; Shelton, Cardinet, & Bandman, 1987). Habitualmente, há aumento da CK e pode igualmente desenvolver-se exoftalmia e febre (Cerde-Gonzalez, 2010). Por outro lado, na fase

crônica, há atrofia muscular marcada e a mobilidade mandibular é reduzida devido à atrofia e fibrose dos músculos mastigadores. Para além disso, deixa de ser doloroso abrir a boca e pode haver afundamento do globo ocular na órbita, por causa da dramática perda de massa muscular localizada (Cauduro et al., 2013; Taylor, 2008).

Sinais clínicos compatíveis com MMM, resultados positivos no teste serológico para pesquisa de anticorpos circulantes contra as fibras 2M e a realização de uma biópsia muscular permitem efetuar o diagnóstico definitivo desta miopatia (Cerde-Gonzalez, 2010; McGavin & Valentine, 2009). Contudo, um diagnóstico falso negativo na pesquisa de anticorpos pode ocorrer se tiverem sido administrados corticosteroides em dose imunossupressora, 7 a 10 dias antes da realização do teste, e também se estiver a decorrer o estadio final da doença, em que há perda de fibras musculares e fibrose (Cerde-Gonzalez, 2010; Melmed et al., 2004). Desta forma, é importante a realização de uma biópsia muscular, obtida geralmente a partir do músculo temporal, para demonstrar a presença de infiltrado linfocítico e plasmocítico em redor das fibras musculares e a nível perivascular (Kaneko et al., 2008). Histologicamente, a doença apresenta padrão multifocal e polifásico, em que a presença de fibras musculares necrosadas e em regeneração é comum. Também a administração de corticosteroides prévia à realização da biópsia pode alterar a componente inflamatória presente (Shelton et al., 1987; Vleet & Valentine, 2007), sendo, ocasionalmente, os eosinófilos o tipo de célula predominante no infiltrado celular. Para terminar, é importante referir que, quando a lâmina basal é danificada, dá-se o desenvolvimento de fibrose. A fibrose é um indicador de prognóstico, pois trata-se de uma mudança irreversível (McGavin & Valentine, 2009). Devido ao padrão histológico da doença, caso sejam visualizadas apenas fibras em degenerescência ou regeneração (mesmo na ausência de inflamação) e a história clínica for compatível com miosite, o caso deve ser considerado suspeito (Vleet & Valentine, 2007). Por fim, há outros procedimentos que podem ajudar no diagnóstico da MMM e incluem a realização de testes laboratoriais (hemograma, análises bioquímicas e serológicas), eletromiografia, radiologia e imagiologia avançada (ressonância magnética [RM] e tomografia axial computadorizada [TAC]) (Cauduro et al., 2013; Melmed et al., 2004). Na Figura 5 encontra-se o diagrama indicado para o diagnóstico desta miosite.

A administração oral de corticosteroides (prednisolona, 1 a 2 mg/Kg BID) geralmente resulta na rápida eliminação da dor em casos agudos e melhora a mobilidade mandibular em cães cronicamente afetados. Após cerca de 3 semanas, a dose de corticosteroides pode ser reduzida para 1 mg/kg SID e depois gradualmente diminuída ao longo de 4 a 6 meses para a menor dose possível (Cerde-Gonzalez, 2010; Shelton & Cardinet, 1990; Taylor, 2008). Caso os efeitos secundários da corticoterapia não sejam toleráveis, pode ser usado outro fármaco imunossupressor, nomeadamente, a azatioprina ou a ciclosporina (Cerde-Gonzalez, 2010; Melmed et al., 2004). Quanto ao prognóstico, este é determinado pelo grau de fibrose presente e pela resposta clínica ao tratamento imunossupressor (Melmed et al., 2004). Geralmente, um tratamento agressivo durante a fase aguda resulta num bom prognóstico (Taylor, 2008). Os pacientes podem

permanecer com atrofia muscular mas geralmente a recuperação funcional é parcial ou completa, sendo o prognóstico para esta miopatia frequentemente bom (Cerde-Gonzalez, 2010). Por fim, deve-se salientar que, cães tratados na fase crônica da doença, têm prognóstico mais incerto mas, conseguem recuperar bem se a extensão da fibrose não levar a uma disfunção maxilar irreversível (Melmed et al., 2004).

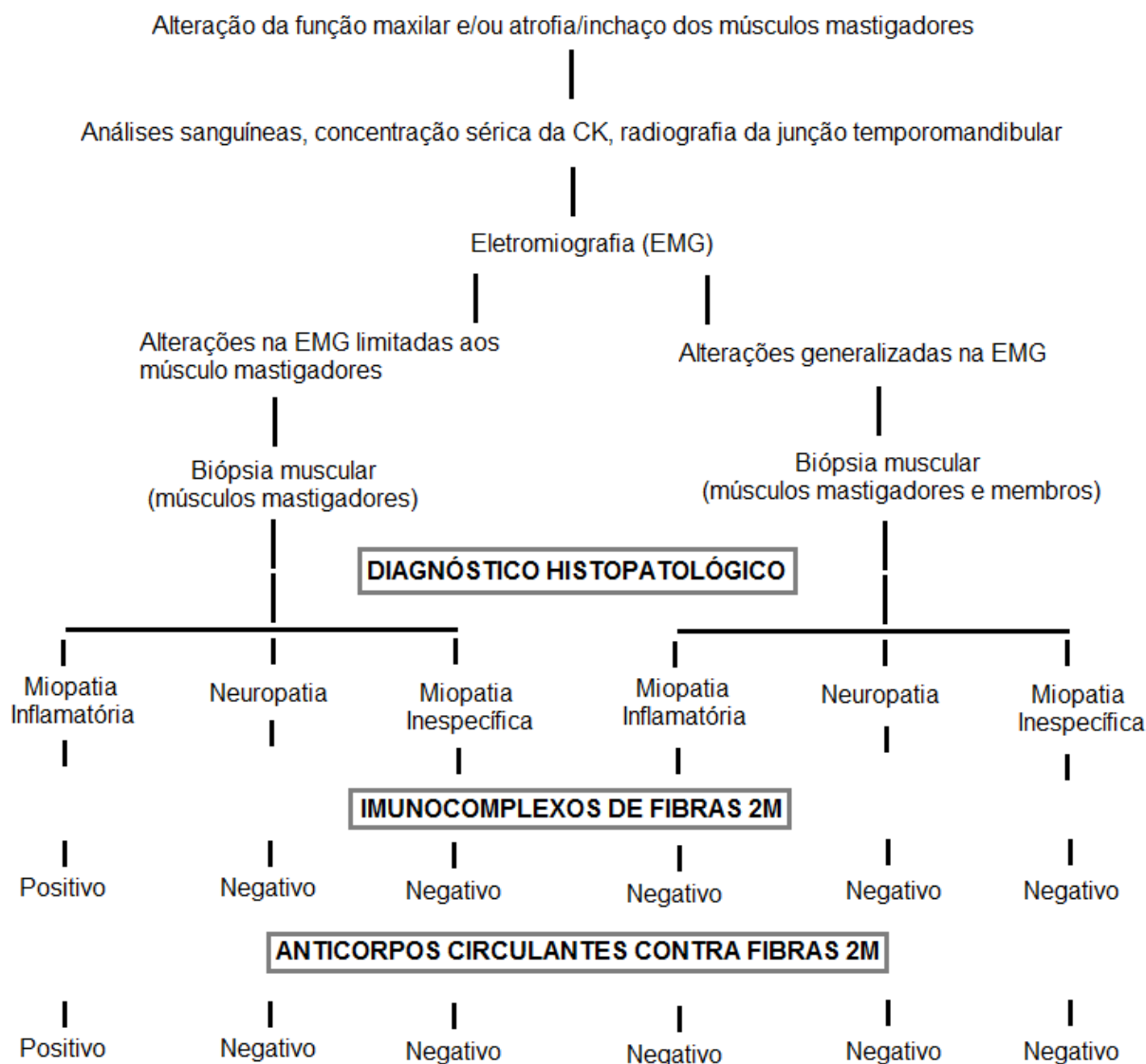


Figura 5 - Diafragma para o diagnóstico da miosite dos músculos mastigadores (MMM) (Adaptado de Shelton & Cardinet, 1990).

5.2.3. Miosite dos músculos extraoculares (EOM)

A miosite extraocular é uma polimiosite bilateral rara que envolve somente os músculos oblíquo e reto extraocular (Vleet & Valentine, 2007; Williams, 2008). A maioria dos casos reportados são em cães da raça Golden Retriever geralmente jovens, com idade média de 8 meses e, sobretudo, do sexo feminino (Adegboye, 2015; McGavin & Valentine, 2009; Taylor, 2008; Williams, 2008).

Os sinais clínicos surgem de forma aguda e caracterizam-se por marcada exoftalmia bilateral com aumento da esclera visível, podendo haver também estrabismo lateral ou exotropia (Cerde-Gonzalez, 2010; Williams, 2008). Esta patologia geralmente não é dolorosa e leva à retração das pálpebras, sendo possível que se desenvolva quemose (Taylor, 2008). As concentrações séricas das enzimas CK e AST costumam apresentar-se dentro dos valores normais (Allgoewer et al., 2000; McGavin & Valentine, 2009).

Na maioria dos casos, o diagnóstico pode ser efetuado com base, apenas, no quadro clínico. Contudo, pode ser benéfico realizar mais exames complementares recorrendo, por exemplo, à ecografia orbital, à RM ou à TAC (Williams, 2008). O diagnóstico definitivo só pode ser feito após análise de biópsia muscular (Taylor, 2008). No entanto, esta nem sempre é executada, visto os músculos afetados serem de difícil acesso para a realização da mesma (Adegboye, 2015; McGavin & Valentine, 2009). A nível histopatológico encontra-se um infiltrado intersticial de células inflamatórias linfocíticas, que estão associados a necrose das fibras musculares e regeneração, num padrão multifocal polifásico (Carpenter et al., 1989; Vleet & Valentine, 2007).

Relativamente ao tratamento, verificou-se uma resposta rápida e completa após a administração de prednisolona PO em dose anti-inflamatória (entre 1 e 2 mg/Kg) (Williams, 2008). Em casos em que o uso deste corticosteroide poderá provocar efeitos secundários indesejados, a azatioprina pode ser usada como substituído do mesmo (Adegboye, 2015). O prognóstico é bom e têm mesmo sido reportados casos de remissão espontânea (Cerde-Gonzalez, 2010; Taylor, 2008).

5.2.4. Dermatomiosite

A dermatomiosite familiar canina tem sido identificada em cães da raça Collie e Pastor de Shetland, sendo semelhante à dermatomiosite juvenil em Medicina Humana (Shelton & Cardinet, 1987). Também têm sido descritos casos noutras raças, nomeadamente, Border Collie, Welsh Corgi e Boiadeiro Australiano (Taylor, 2008). Trata-se de uma doença autoimune hereditária que afeta o tecido muscular, o cutâneo e, por vezes, os vasos sanguíneos (Cerde-Gonzalez, 2010; Hargis, Haupt, Hegreberg, Prieur, & Moore, 1984).

Os animais afetados desenvolvem pápulas, vesículas, pústulas e alopecia focal a nível da face, orelhas, cauda e a nível das proeminências ósseas por volta das 12 - 14 semanas de idade (Cerde-Gonzalez, 2010; Gross & Kunkle, 1987; Taylor, 2008). A evolução clínica da doença é muito variável, podendo as lesões cutâneas desaparecer no espaço de 1 semana a 1 mês; noutros casos trata-se de um processo crónico (Gross & Kunkle, 1987).

A miosite costuma desenvolver-se após as lesões dérmicas mas os sinais de doença muscular, como atrofia e disfunção, só surgem em casos mais graves. No entanto, é comum a presença de disfagia e regurgitação, resultante do megaesófago (Cerde-Gonzalez, 2010; Hargis et al., 1984; Taylor, 2008). Por outro lado, os achados histopatológicos reportam a presença de uma acumulação

perivascular e intersticial de linfócitos, plasmócitos, macrófagos e neutrófilos, juntamente com degeneração das fibras musculares, regeneração, atrofia e fibrose (Shelton & Cardinet, 1987).

O diagnóstico definitivo desta doença é efetuado com base nos achados clínicos, na realização de biópsia muscular e cutânea e por eletromiografia (Gross & Kunkle, 1987; Hargis et al., 1984). O tratamento, caso haja envolvimento muscular, inclui a utilização de corticosteroides, como a prednisolona, em dose imunossupressora. Para as lesões dermatológicas os animais podem responder à administração oral de tetraciclina e niacinamida ou pentoxifilina (Cerde-Gonzalez, 2010; Taylor, 2008). O prognóstico costuma ser bom, apesar de poderem ocorrer recidivas (Hargis et al., 1984).

5.3. Miopatias metabólicas adquiridas

5.3.1. Miopatia hipotiroideia

Alterações da glândula tireoide podem induzir modificações profundas no músculo esquelético e são frequentemente acompanhadas por manifestações de doença neuromuscular (Kaneko et al., 2008). A nível fisiológico, o hipotiroidismo causa distúrbios no processo metabólico e reduz o *turnover* proteico, levando a que ocorra diminuição da capacidade de reparação e substituição das proteínas do tecido muscular (Shelton & Cardinet, 1987).

A ligeira miopatia que surge associada ao hipotiroidismo pode causar fraqueza, atrofia muscular e intolerância ao exercício (Cerde-Gonzalez, 2010; Taylor, 2008). Ao quadro clínico inicial pode também estar associada a presença de movimentos rígidos e mialgia (Shelton, 2006). Quanto às concentrações séricas de CK, estas podem estar normais ou ligeiramente elevadas, se existir necrose muscular (Fors, 2006; McGavin & Valentine, 2009; Shelton, 2006). A probabilidade do paciente desenvolver miopatia aumenta se estiverem presentes outras endocrinopatias como, por exemplo, diabetes mellitus e hiperadrenocorticism (Vleet & Valentine, 2007).

A análise da biópsia muscular revela alteração no tamanho das fibras musculares, com perda e atrofia seletiva das fibras tipo II e consequente predominância das fibras tipo I (Goedegebuure, 1987; Kaneko et al., 2008). As fibras atrofiadas são ovais ou de contornos angulares e estão presentes ao longo de todos os feixes musculares (Vleet & Valentine, 2007). Podem ser encontrados, especialmente nas fibras do tipo I, bastonetes de nemalina (Cerde-Gonzalez, 2010). Por fim, não se encontram presentes células inflamatórias, nem há sinais de miodegeneração (Goedegebuure, 1987). Desta forma, os resultados obtidos pela biópsia muscular, juntamente com o quadro clínico, permitem suspeitar que se trata de miopatia hipotiroideia. Contudo, e de modo a suportar o diagnóstico, é sempre recomendado avaliar a função da tireoide e verificar se o paciente melhora com a suplementação hormonal (Cerde-Gonzalez, 2010; Fors, 2006; McGavin & Valentine, 2009).

A partir do momento em que o paciente inicia o tratamento com levotiroxina, uma hormona sintética, há reversão da maioria dos sinais clínicos e também das lesões microscópicas (Fors, 2006; Vleet &

Valentine, 2007). Assim, a partir do momento em que o estado de eutiroideu é restabelecido, o prognóstico para recuperação da força muscular é excelente (Shelton, 2006).

5.3.2. Miopatia corticosteroide

O excesso de glucocorticoides no organismo pode levar ao aparecimento de uma miopatia degenerativa (Taylor, 2008). Tanto o hiperadrenocorticismismo que surge de forma espontânea, como o iatrogénico podem levar ao aparecimento desta síndrome (Goedegebuure, 1987). O excesso de hormonas glucocorticoides leva à perda progressiva de massa muscular, devido ao aumento do catabolismo e da inibição da síntese de proteínas miofibrilares (Kaneko et al., 2008; Shelton & Cardinet, 1987). Na miopatia esteroide exógena a atrofia e a fraqueza muscular podem ser profundas e são os sinais clínicos mais frequentes (Shelton, 2006; Swinney, Foster, Church, & Malik, 1998). Já no caso do hiperadrenocorticismismo endógeno, para além dos problemas já referidos, pode também haver rigidez dos membros pélvicos e incapacidade de locomoção (McGavin & Valentine, 2009; Shelton, 2006; Vleet & Valentine, 2007).

Pode-se suspeitar do diagnóstico com base na história de administração exógena de glucocorticoides ou quando estão presentes sinais clínicos consistentes com um excesso destas hormonas (Taylor, 2008). A biópsia muscular revela ligeiras alterações degenerativas com variação do tamanho das fibras musculares, necrose focal com fagocitose, *splitting* de fibras, presença de núcleos internos e infiltração adiposa a nível celular (Goedegebuure, 1987). É evidente a atrofia seletiva das fibras do tipo II, bem como a presença de bastonetes de nemalina e de fibras vermelhas rasgadas (Cerdeira-Gonzalez, 2010; Vleet & Valentine, 2007). Por sua vez, o diagnóstico é confirmado com a realização de testes para o hiperadrenocorticismismo (Taylor, 2008).

No caso da miopatia esteroide exógena, o tratamento de eleição passa pela redução da dose de glucocorticoides administrada, caso a condição subjacente esteja controlada. Para além disto, a prática de exercício físico pode prevenir parcialmente o desenvolvimento de fraqueza muscular (Shelton, 2006). O tratamento médico ou cirúrgico para o hiperadrenocorticismismo endógeno pode levar à resolução das lesões musculares, exceto em casos de atrofia profunda ou quando a contração da musculatura dos membros pélvicos é grave (Vleet & Valentine, 2007). Também a suplementação com L-carnitina, coenzima Q10 e riboflavina podem melhorar a força muscular. Contudo, o prognóstico para uma resolução completa da miopatia é mau (Shelton, 2006; Taylor, 2008).

5.4. Alterações involuntárias do tónus muscular

A tetania, o opistótono, a mioclonia e a discinesia são alterações involuntárias do tónus muscular resultantes de outras doenças que não do foro muscular (Taylor, 2008). A tetania é caracterizada pela contração tónica persistente dos músculos (Burkitt, Sturges, Jandrey, & Kass, 2007). Já o opistótono está descrito como uma forma grave de tetania, em se desenvolvem espasmos dos

músculos dos membros e pescoço, levando a que o paciente fique em decúbito lateral com dorsoflexão do pescoço e extensão rígida dos membros (Sprott, 2008). Por fim, a mioclonia é uma contração breve, rítmica e repetitiva de um determinado grupo de músculos (Kojovic, Cordivari, & Bhatia, 2011). As mioclonias costumam surgir na fase nervosa da esgana, altura em que se desenvolve meningoencefalite. Contudo, outras lesões neoplásicas ou focais inflamatórias podem, ocasionalmente, levar ao aparecimento de mioclonias. Está também descrito uma doença mioclónica familiar reflexa em cães da raça Labrador Retriever (Taylor, 2008).

5.4.1. Tetania e opistótonos

Casos de perda de consciência associados a tetania ou opistótono têm sido observados em cães com doenças graves do tronco cerebral de etiologia infecciosa, traumática ou neoplásica. No entanto, a presença de tetania e opistótonos sem alteração do estado mental do paciente pode ocorrer em casos de trauma do cerebello ou na infecção por *Clostridium tetani* (Taylor, 2008).

C. tetani é um bacilo anaeróbico estrito, com a capacidade de formar esporos e que, na sua forma vegetativa, tem a capacidade de produzir uma potente neurotoxina, a tetanospasmina (Risio, Zavattiero, Venzi, Bue, & Poncelet, 2006). O tétano é uma doença neurológica causada pela ação desta neurotoxina e que se desenvolve, geralmente, após uma ferida profunda ficar contaminada com *C. tetani* (Sprott, 2008). Para além das feridas profundas, a via de transmissão também pode ser feita através de lesões cutâneas, feridas penetrantes, mordeduras, picadas de ixodídeos e feridas cirúrgicas (Fawcett & Irwin, 2014). No cão, trata-se de uma doença rara devido à resistência inerente que estes apresentam à toxina tetanospasmina, levando a que esta tenha dificuldade em penetrar e se ligar ao tecido nervoso (Burkitt et al., 2007). Contudo, nos cães que acabam por ficar infetados, o período de incubação pode ir de 3 até 20 dias (Taylor, 2008).

Clinicamente podem ser encontradas duas formas distintas de tétano, a localizada e a generalizada. Na forma localizada os pacientes têm um único músculo ou membro, próximo do local de infeção, que se torna rígido. Esta rigidez costuma alastrar para o membro oposto e, se não for tratada, pode passar a afetar todo o sistema nervoso central e mimetizar a forma generalizada (Risio et al., 2006; Sprott, 2008). Já os animais afetados pela forma generalizada possuem não só rigidez dos músculos dos membros, pescoço e cauda, bem como alterações dos músculos faciais, nomeadamente, riso sardónico, trismo e prolapso da terceira pálpebra (Acke, Jones, Breathnach, Mcallister, & Mooney, 2004). Também está descrito o aparecimento de enoftalmia, orelhas eretas, alteração da expressão facial, torcicolo, hipertonicidade do esfíncter uretral e anal, dispneia, disfagia, ptialismo, vômito, regurgitação, anorexia, hiperestesia e hipersensibilidade a estímulos auditivos (Burkitt et al., 2007; Fawcett & Irwin, 2014; Sprott, 2008).

O diagnóstico presuntivo de tétano pode ser alcançado com base na história, nos sinais clínicos e na progressão da doença (Acke et al., 2004; Risio et al., 2006). A presença de uma ferida pode ajudar a suportar o diagnóstico, contudo, pode não ser encontrada nenhuma lesão devido ao longo

período de incubação (Sprott, 2008). O tempo que decorre do início dos sinais clínicos até ao começo do tratamento específico e de suporte é crucial para a sobrevivência de pacientes com tétano (Burkitt et al., 2007).

O tratamento do tétano tem por base três princípios: o primeiro é neutralizar a tetanospasmina em circulação recorrendo à antitoxina; o segundo passa por inibir o crescimento do bacilo *C. tetani* com fármacos antimicrobianos e, por fim, o terceiro é providenciar uma cuidada terapia de suporte até o efeito da toxina desaparecer (Fawcett & Irwin, 2014; Sprott, 2008). A antitoxina tetânica deve fazer parte de um protocolo terapêutico inicial e deve ser administrada via IV (200 a 1000 U/Kg, no máximo 20.000 U) para permitir que a concentração sanguínea terapêutica se mantenha por 14 dias (Acke et al., 2004; Taylor, 2008). A penicilina é o antibiótico de eleição para o tratamento do tétano e deve ser administrada via parental e no local da ferida (Sprott, 2008). Inicialmente, costuma ser usada penicilina G aquosa via IV (40.000 U/Kg q8h) e depois pode ser administrada penicilina G procaína via IM (40.000 U/Kg q12h). Em alternativa pode ser utilizado o metronidazol (10 a 15 mg/Kg IV q8h) pois, é um agente bactericida contra a maior parte dos anaeróbios e atinge concentrações terapêuticas até em tecidos necróticos (Acke et al., 2004; Taylor, 2008). Quanto ao tratamento de suporte, é importante controlar os espasmos musculares e as convulsões que possam surgir, sem contudo, interferir com a função motora voluntária (Fawcett & Irwin, 2014). O diazepam é um fármaco frequentemente utilizado devido à sua ação combinada de relaxante muscular, anticonvulsivo e ansiolítico (Acke et al., 2004). Também pode ser utilizada uma combinação de clorpromazina, fenobarbital e diazepam. É igualmente necessário colocar o paciente num ambiente calmo e de preferência escuro, de forma a diminuir o estímulo sensorial e os consequentes espasmos musculares (Taylor, 2008). Deve ser feita fluidoterapia de manutenção IV, com recurso a fluidos isotónicos para manter o paciente hidratado (Sprott, 2008). Em casos graves de disfagia e regurgitação pode ser necessária a colocação de um tubo de alimentação. Se o paciente desenvolver espasmos laríngeos pode ser necessária a realização de traqueostomia (Acke et al., 2004). Para finalizar, a fisioterapia é importante para melhorar a circulação sanguínea e facilitar a drenagem linfática a partir do tecido muscular. Também ajuda a relaxar músculos espásticos e a aliviar o desconforto (Fawcett & Irwin, 2014).

Quanto ao prognóstico, aproximadamente 58% a 77% dos pacientes com tétano recuperam, sendo que a forma localizada tem um prognóstico mais favorável que a forma generalizada (Sprott, 2008). A maioria dos pacientes começa a mostrar sinais de melhoria logo 1 semana após se ter iniciado o tratamento e é frequente recuperarem totalmente ao fim de 4 semanas (Taylor, 2008). Contudo, e apesar do prognóstico dos pacientes a receberem tratamentos ser bom, como a recuperação é prolongada, muitos cães acabam por ser submetidos a eutanásia devido aos custos elevados de hospitalização (Fawcett & Irwin, 2014).

5.5. Doenças da junção neuromuscular

5.5.1. Miastenia gravis adquirida

A miastenia gravis (MG) é uma doença imunomediada em que há produção de autoanticorpos contra os receptores nicotínicos pós-sinápticos de acetilcolina, localizados na junção neuromuscular do tecido muscular esquelético (Clooten, Woods, & Smith-Maxie, 2003; Webb, Taylor, & McPhee, 1997). Desta forma, há perda de receptores nicotínicos de acetilcolina porque os autoanticorpos se ligam aos mesmos, resultando na perda de transmissão neuromuscular e uma fraqueza muscular marcada (Shelton, Cardinet, & Lindstrom, 1988). Contudo, os sinais clínicos dependem do grupo de músculos afetado, podendo a MG ter várias apresentações (Clooten et al., 2003). Estão descritas três apresentações clínicas distintas da MG adquirida (Shelton, 2006). A primeira é a MG focal, cuja principal característica costuma ser a presença de megaesôfago com regurgitação. Pode igualmente haver envolvimento dos músculos da faringe e laringe, e dos músculos oculares (Webb et al., 1997). A segunda é a MG generalizada, em que a fraqueza muscular apendicular é acompanhada por megaesôfago. Por fim, a terceira é a MG aguda fulminante, em que se desenvolve rapidamente fraqueza muscular grave, colapso e megaesôfago (Richardson, 2011). A apresentação clínica clássica de um cão com MG adquirida é episódica e passa por fraqueza muscular generalizada, mais marcada ao nível dos músculos apendiculares, e que tem tendência a agravar-se com a prática de exercício físico e a melhorar com o descanso (Dewey, Bailey, Shelton, Kass, & Cardinet, 1997). Aparentemente, o aparecimento dos sinais clínicos segue uma distribuição bimodal, sendo raro encontrar cães afetados antes do ano de idade, com os picos de incidência a ocorrer aos 3 anos e aos 10 anos de idade (Kaneko et al., 2008). As raças em risco de desenvolver MG adquirida são o Pastor Alemão, o Golden Retriever, o Akita, o Chihuahua, o Braco Alemão e a maioria das raças Retriever (Vleet & Valentine, 2007).

Um diagnóstico precoce e preciso desta doença, seguido de terapêutica apropriada, é o fator mais importante para obter uma boa recuperação clínica (Shelton, 2006). Pode-se suspeitar do diagnóstico com base nos achados clínicos, recorrendo à eletromiografia e administrando anticolinesterásicos de curta ação como o cloreto de edrofônio (Tensilon) (McGavin & Valentine, 2009; Richardson, 2011). As alterações histológicas ao nível do tecido muscular são inespecíficas e esporádicas com a presença de fibras do tipo II atrofiadas, mionecrose, focos isolados de linfócitos e fibrose (Goedegebuure, 1987; Shelton & Cardinet, 1987). Contudo, o diagnóstico da MG só se torna definitivo quando se faz a deteção de anticorpos circulantes contra os receptores de acetilcolina, recorrendo a imunoprecipitação por radioimunoensaio (Kaneko et al., 2008; Shelton, 2010). Este teste de diagnóstico possui alta sensibilidade e especificidade, detetando, aproximadamente, 98% dos cães com a forma generalizada de MG (Clooten et al., 2003). É importante lembrar que a MG pode estar associada a outras doenças endócrinas, imunomediadas e neoplásicas, nomeadamente, hipotireoidismo, hipoadrenocorticism, trombocitopenia ou anemia

hemolítica. A MG pode igualmente surgir como síndrome paraneoplásica relacionada com a presença de timomas, osteossarcomas e linfomas cutâneos (Richardson, 2011).

O tratamento da MG adquirida envolve a utilização de agentes anticolinesterásicos (Dewey et al., 1997). No entanto, na maioria dos cães, a fraqueza muscular não é adequadamente controlada recorrendo unicamente à terapia anticolinesterásica. É então recomendado fazer a associação com terapia imunossupressora ou utilizar somente esta última (Clooten et al., 2003). Os agentes imunossupressores mais utilizados são a prednisolona, a azatioprina e a ciclosporina. É igualmente importante fazer o manejo correto do animal com megaesófago e recorrer à antibioterapia, caso haja pneumonia por aspiração (Richardson, 2011).

O prognóstico para cães com MG é variável. Quando se está perante um caso de MG aguda fulminante, megaesófago persistente, pneumonia por aspiração grave ou timoma, o prognóstico é mau (Clooten et al., 2003). Em pacientes com MG focal, há relatos de casos em que ocorreu melhora clínica espontânea. No entanto, podem ser precisos meses para que haja remissão total e é recomendado que sejam monitorizados, no soro, os níveis de anticorpos contra os recetores de acetilcolina (Webb et al., 1997).

5.6. Neoplasias do tecido muscular esquelético

Os tumores primários do tecido muscular esquelético são pouco comuns, podendo ser benignos (rabdomioma) ou malignos (rabdomiossarcoma) (McGavin & Valentine, 2009). Geralmente ambos têm mais tendência para surgir em cães jovens (Morris & Dobson, 2001).

Quando estão a ser avaliados tumores que envolvem o músculo esquelético, é preciso ter em atenção que há tumores não miogénicos infiltrativos e metástases a nível muscular que podem causar lesões extensas e levar ao aparecimento de fibras regenerativas bizarras, com a capacidade de mimetizar células neoplásicas (Vleet & Valentine, 2007).

5.6.1. Rabdomioma

O rabdomioma é um tumor benigno raro do tecido muscular estriado, que surge com menor frequência que o rabdomiossarcoma (Dunbar, Ginn, Winter, Miller, & Craft, 2012). Os locais mais comuns para o desenvolvimento deste tumor benigno são o miocárdio e o tecido muscular esquelético da laringe (Zaher & Metz, 2009).

O rabdomioma laríngeo tem sido referido em cães com idades compreendidas entre os 2 e os 10 anos. Como o tumor costuma invadir o lúmen da laringe, os sinais clínicos costumam ser dispneia, estridor e disfonia (Vleet & Valentine, 2007). A nível microscópico, recorrendo à coloração hematoxilina e eosina, estes tumores apresentam células de grandes dimensões, redondas e moderadamente pleomórficas, com um citoplasma abundantemente vacuolado e com grânulos eosinofílicos (Meuten et al., 1985). Como a aparência histológica deste tumor é semelhante à de oncócitos e de tumores de células granulares, é importante avaliar as características

ultraestruturais e recorrer à imunohistoquímica (Dunbar et al., 2012). Assim, a observação de fibras musculares com linhas Z e de miofilamentos primitivos a nível ultraestrutural, bem como a presença de mioglobina e desmina na imunohistoquímica permitem confirmar que os tumores são realmente de origem muscular esquelética (Meuten et al., 1985; Vleet & Valentine, 2007).

5.6.2. Rabdomiossarcoma

O rabdomiossarcoma é um tumor maligno raro que pode ter origem em células musculares estriadas, em células progenitoras das musculares estriadas ou em células mesenquimatosas primitivas com capacidade de se diferenciarem em células musculares estriadas (Chapman, Nabity, & Calise, 2008). Em cães, os locais mais comuns para o aparecimento desta neoplasia são a língua, a laringe, o miocárdio e a bexiga (Liptak & Forrest, 2007).

Com base nos achados histopatológicos, os rabdomiossarcomas podem ser classificados como embrionários, botrioides (variante embrionária), alveolares e pleomórficos (Brellou, Psychas, & Vlemmas, 2013; Scott, Teixeira, Flanders, Dubielzig, & Mclellan, 2015). A forma de rabdomiossarcoma mais comum nos cães é a embrionária, que é composta maioritariamente por células redondas primitivas com núcleos eucromáticos proeminentes e citoplasma eosinofílico. Esta forma embrionária ocorre frequentemente na região da cabeça e/ou do pescoço, incluindo a cavidade oral (McGavin & Valentine, 2009; Vleet & Valentine, 2007).

Contudo, o diagnóstico histológico deste tumor é difícil e a marcação imunohistoquímica para a vimetina, a actina muscular esquelética, a mioglobina, a miogenina e a MyoD podem ser necessárias para chegar ao diagnóstico definitivo (Liptak & Forrest, 2007; Yamate et al., 2011). É importante que o diagnóstico seja realizado precocemente porque o rabdomiossarcoma é um tumor agressivo, que metastiza rapidamente (Gandi & Vivekanand, 2012; McGavin & Valentine, 2009). Os principais locais de metastização são os linfonodos regionais, o pulmão e o baço (Chapman et al., 2008).

Quanto ao tratamento, a maioria dos sarcomas de tecidos moles, onde se enquadra o rabdomiossarcoma, têm sido tratados recorrendo tanto a cirurgia para reduzir o volume do tumor, como a radioterapia pós-operatória (Gandi & Vivekanand, 2012). No entanto, o prognóstico ainda não foi determinado porque esta neoplasia é raramente diagnosticada no cão e, ainda menos frequentemente, é tratada com intenção curativa (Liptak & Forrest, 2007). Em suma, a avaliação histológica e ultraestrutural, aliada à imunohistoquímica, podem ser necessárias para obter um diagnóstico definitivo, e determinar quais as opções terapêuticas e o respetivo prognóstico (Chapman et al., 2008).

Capítulo IV – Otimização da Caracterização de Fibras Musculares Estriadas em Cão por Histoquímica e Imunohistoquímica.

1. Introdução

Neste trabalho experimental foram realizadas tanto técnicas histoquímicas como imunohistoquímicas. É sabido que um painel standardizado de colorações histoquímicas permite obter informações sobre as propriedades morfológicas, bioquímicas e metabólicas das fibras musculares (Kaneko et al., 2008; Shelton, 2010). Apesar de, neste trabalho, não terem sido realizadas todas as colorações histoquímicas que são efetuadas na prática em Medicina Humana, foram escolhidas as seguintes: adenosina trifosfatase (ATPase) ácido resistente (pH=4,6); adenosina trifosfatase (ATPase) alcalina (pH=9,4) e desidrogenase *tetrazolium* redutase do ácido nicotínico (NADH desidrogenase). Estas técnicas foram efetuadas em cortes de congelação e escolhidas com base na sua funcionalidade e facilidade em as realizar e analisar a consistência dos resultados obtidos. Deste modo, as técnicas ATPases 4,6 e 9,4 permitem a diferenciação e distribuição dos tipos de fibras musculares e dos seus subtipos. Já a NADH desidrogenase cora mitocôndrias e permite analisar várias vias metabólicas presentes noutros organitos, mostrando em detalhe as estruturas sarcoplasmáticas, marcando essencialmente o retículo intermiofibrilhar. Esta técnica, para além de revelar qual a distribuição das mitocôndrias, também permite identificar o tipo de fibras musculares, marcando com maior intensidade as fibras de metabolismo oxidativo (Alves, Dâmaso, & Pai, 2008; McGavin & Valentine, 2009; Paciello & Papparella, 2009). Foi também realizada a coloração Hematoxilina e Eosina (H&E), tanto em cortes de músculo fixados em formol, como em cortes de congelação. Esta coloração básica em histologia e histopatologia permite identificar uma série de alterações morfológicas, nomeadamente a dimensão das miofibras e o posicionamento dos mionúcleos, avaliar a localização de vasos sanguíneos e de nervos e identificar a existência de inflamação (Paciello & Papparella, 2009).

Decidiu-se igualmente recorrer à imunohistoquímica, pois esta técnica é complementar à histoquímica, permitindo a visualização e localização de componentes proteicos específicos do tecido muscular (Dubowitz et al., 2013). Assim, foram selecionados dois anticorpos, o MHC-*slow* e o MHC-*fast*, que serviram, maioritariamente, para facilitar a tipificação das fibras musculares esqueléticas. Estes anticorpos permitem a marcação da miosina em músculos fixados em formol (McGavin & Valentine, 2009). Desta forma, o MHC-*slow* marca a isoforma *slow* da cadeia pesada da miosina (MHC) e o MHC-*fast* marca a isoforma *fast* do MHC, correspondendo às fibras musculares tipo I e tipo II, respetivamente (Costin-Kelly, 2008).

2. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivos:

- Identificar e realizar as técnicas histoquímicas necessárias para a tipificação das fibras musculares estriadas esqueléticas e que permitem auxiliar no diagnóstico de doenças musculares em cães;
- Otimizar as técnicas histoquímicas disponíveis e aplicá-las, primeiramente, em vários músculos, previamente selecionados, de cães sem patologia muscular;
- Realizar as técnicas de imunohistoquímica, recorrendo aos anticorpos MHC-*slow* e MHC-*fast*, em vários músculos de cães sem patologia muscular;
- Descrever e analisar as características histoquímicas e imunohistoquímicas de alguns músculos com tipologia diversa da espécie canina;
- Aplicar as técnicas imunohistoquímicas em três casos clínicos de arquivo recolhidos do Laboratório VetPat e interpretar os resultados obtidos;
- Montar no Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-ULisboa os meios de diagnóstico anátomo-patológico que sejam mais simples e eficazes, e que representem uma mais-valia para o diagnóstico das doenças musculares caninas.

3. Material e Métodos

3.1. Seleção e obtenção das amostras

Para a realização da técnica histológica de rotina, da histoquímica e da imunohistoquímica foram recolhidas amostras de tecido muscular provenientes de dois canídeos que foram submetidos a eutanásia no Hospital Escolar da FMV-ULisboa. Nenhum deles apresentava sinais clínicos relacionados com a existência de doença muscular. O cão A tinha 13 anos e era uma fêmea da raça Caniche. Já o cão B tinha 11 anos e era um Rafeiro Alentejano macho.

Os músculos selecionados para serem submetidos a biópsia foram o temporal, o masséter, o diafragma e o bicípede femoral. O temporal e o masséter (Figura 6) foram selecionados por se tratarem de músculos mastigadores. Já o diafragma e o bicípede femoral foram escolhidos por serem representativos de um tipo de fibra muscular. Enquanto, o diafragma tem, teoricamente, maior percentagem de fibras do tipo I, o bicípede femoral possui mais fibras do tipo II na sua constituição.

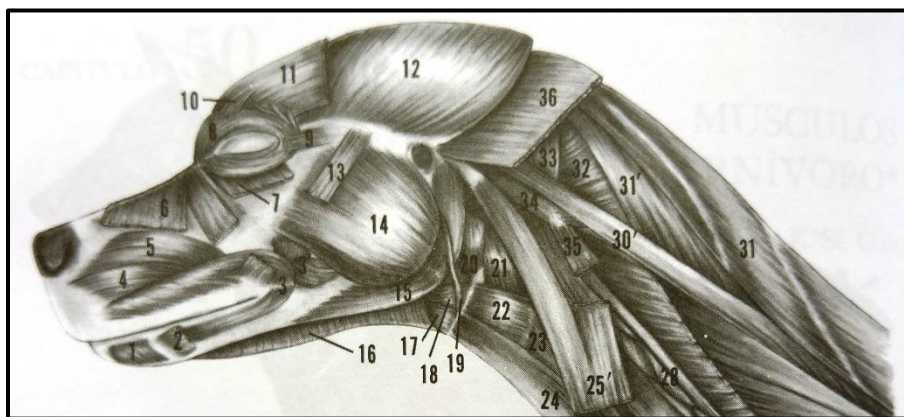


Figura 6 – Localização do músculo temporal (12) e masséter (14) no cão (Adaptado de Clair, 1986).

De cada músculo foram recolhidas duas amostras com cerca de 3,0 x 1,0 x 1,0 cm. A recolha foi feita de modo a que a excisão respeitasse a orientação longitudinal das fibras musculares. Uma das amostras foi colocada em formol tamponado a 10% e a outra sobre uma gaze humedecida em solução salina isotónica (amostra a fresco).

3.2. Processamento das amostras

3.2.1. Técnica histológica de rotina

Uma amostra de cada músculo selecionado (temporal, masséter, diafragma e bicípede femoral) foi fixada em formol tamponado a 10% durante 24 horas. Posteriormente foi feita a seleção macroscópica do material que seguiria para processamento e inclusão em parafina. Os fragmentos de tecido muscular foram colocados nas cassetes de forma a se obterem cortes longitudinais e transversais de cada músculo. O processamento para a histopatologia de rotina, com inclusão em parafina, foi efetuado de forma automática, recorrendo ao processador de tecidos Leica TP 1020® (Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha).

O corte dos blocos de parafina foi feito num micrótomo rotativo Leica RM 2135®. Foram realizados cortes com 3 µm de espessura, que foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E). O protocolo desta técnica de coloração está disponível no Anexo I. Para terminar, os cortes foram montados entre lâmina e lamela com Entellan®.

A H&E foi também aplicada em cortes de congelação, tendo as amostras sido processadas como as que foram utilizadas para histoquímica. Depois dos cortes com 10 µm de espessura terem sido recolhidos em lâminas, ficaram 2 minutos na Hematoxilina de Harris, depois foram passados por água da torneira e, posteriormente, permaneceram 3 minutos em Eosina G. De seguida foram feitas passagens por álcool com concentrações crescentes. Pode ser necessário, primeiramente, filtrar a Hematoxilina. Pelo facto das amostras utilizadas serem frágeis, estas não foram diferenciadas com solução álcool-ácido.

3.2.2. Técnicas de histoquímica

A congelação das várias amostras de tecido muscular foi realizada no Laboratório de Neuropatologia do Serviço de Neurologia do Hospital de Santa Maria, com auxílio do Mestre Pedro Pereira. A congelação deve ser efetuada até 4 horas após a recolha das amostras. O ideal é que o procedimento seja realizado o mais rapidamente possível. No presente caso, o espaço de tempo entre a recolha das amostras e a sua congelação foi de, aproximadamente, 1 hora e 30 minutos.

Para cada músculo foram cortados 4 fragmentos com 4mm de lado, os quais foram colocados sobre discos de cortiça por meio de uma goma adragante (Sigma®) a 10% (Figura 7).



Figura 7 - Colocação dos fragmentos de tecidos muscular sobre discos de cortiça com goma adragante a 10% (Sigma®).

Os fragmentos de tecido muscular foram congelados em isopentano, que foi arrefecido com azoto líquido a -160 °C. Para congelar o isopentano líquido foi necessário, primeiramente, encher um recipiente isotérmico com azoto líquido e mergulhar um copo de plástico com isopentano no seu

interior (Figura 8A). Os fragmentos de tecido muscular fixados à cortiça foram mergulhados no isopentano durante cerca de 30 segundos (Figura 8B) e depois introduzidos em tubos de plástico que já tinham sido colocados no congelador a -80 °C para estarem devidamente arrefecidos. Este passo foi efetuado o mais rapidamente possível para impedir o descongelamento das amostras.

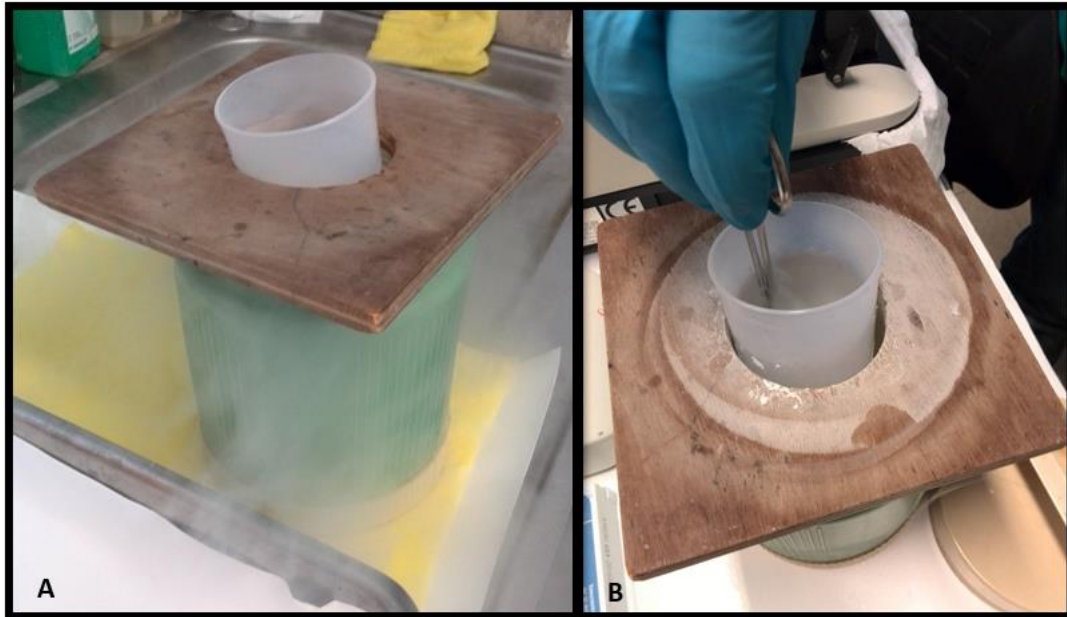


Figura 8 - Congelação do isopentano em azoto líquido (A) e imersão de uma das amostras de tecido muscular em isopentano (B).

Os cortes de congelação com 10 µm de espessura foram obtidos com o auxílio do crióstato Microm® HM550 (Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos da América), a -23 °C/-25 °C (Figura 9) e colocados em lâminas ou lamelas.

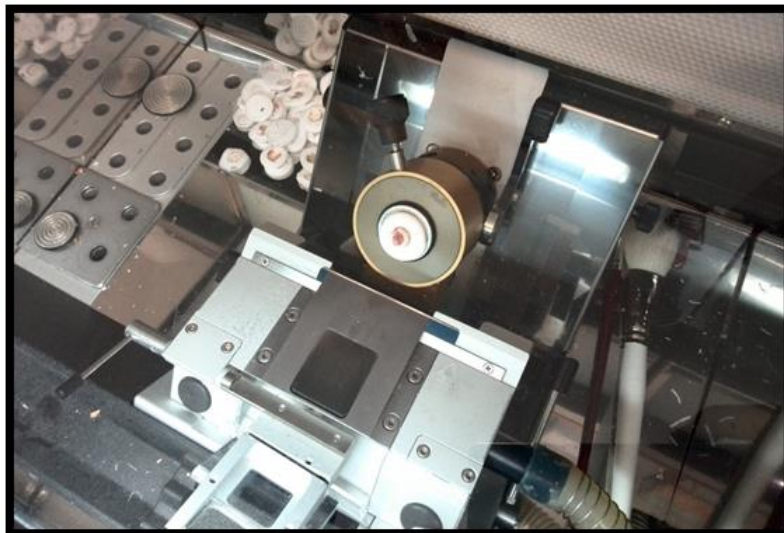


Figura 9 - Crióstato Microm® HM550 com bloco de tecido muscular congelado.

Foram recolhidos 4 cortes por lamela e utilizadas 2 lamelas para cada coloração histoquímica de cada músculo. As lamelas ficaram cerca de 30 minutos à temperatura ambiente e só depois foram

envolvidas em papel de alumínio, para ficarem no congelador *overnight* antes de se efetuarem as seguintes colorações histoquímicas:

- Adenosina trifosfatase (ATPase) ácido resistente (pH=4,6);
- Adenosina trifosfatase (ATPase) alcalina (pH=9,4);
- Desidrogenase *tetrazolium* redutase do ácido nicotínico (NADH desidrogenase).

Para a realização destas técnicas, as lamelas foram colocadas à temperatura ambiente 30 minutos antes de se iniciar a coloração, de forma a garantir o funcionamento correto das enzimas utilizadas. As soluções usadas nas técnicas de ATPase 4,6 e 9,4 e na NADH desidrogenase podem ser armazenadas a -20 °C durante 6 meses. Uma vez descongeladas não podem ser reutilizadas. Assim, descongelaram-se, à temperatura ambiente cerca de 10 ml de cada solução necessária.

Relativamente às técnicas ATPase 4,6 e 9,4, cujo protocolo se encontra disponível nos Anexos II e III, foi necessário alterar o pH das soluções de pré-incubação de forma a obter maior precisão na diferenciação do tipo de fibras musculares de canídeo. Assim, de um pH de 4,6 foi preciso torná-lo ainda mais ácido e passá-lo para 4,45 na técnica ATPase 4,6. Já na técnica ATPase 9,4, o pH da solução de pré-incubação passou de 10,2 para 10,35. A acidificação do pH destas soluções fez-se pela adição de ácido clorídrico (HCl) 0,1 N e a alcalinização pela adição de hidróxido de sódio (NaOH) 2 M. Estes ajustes de pH foram realizados com auxílio do medidor de pH CRISON® micropH 2001, que sofreu uma calibração prévia antes de ser utilizado.

Na técnica ATPase 4,6, a solução de pré-incubação é composta por 1,3605 g de acetato de sódio e 1,44 ml de ácido acético glacial a 100%, diluídos em 100 ml de água destilada. Relativamente à técnica ATPase 9,4, a solução de pré-incubação é tampão tris-cálcio composto por 1,215 g de tris e 0,2 g de cloreto de cálcio em 100 ml de água destilada. Também o tempo de incubação destas soluções de pré-incubação teve de ser aumentado 5 minutos, em ambas as técnicas.

Já a solução de incubação foi a mesma para as duas ATPases e é constituída pelo tampão tris-cálcio, mencionado anteriormente, e por 0,15 g de adenosina trifosfato (ATP). O pH desta solução foi ajustado para 10,2. A duração do tempo de incubação com esta solução teve de ser aumentado de 45 para 50 minutos, no caso da ATPase 4,6 e de 30 para 35 minutos, na técnica ATPase 9,4.

Quanto à técnica NADH desidrogenase, cujo protocolo se encontra no Anexo IV, foi igualmente necessário modificar o tempo de incubação de 30 minutos para 1 hora, para que a marcação das devidas estruturas celulares fosse a correta. A solução de incubação desta técnica é constituída por 100 ml de tampão tris (composto por 0,605 g de tris, 40 ml de HCl 0,1 N e 60 ml de água destilada), 0,1 g de *nitroblue tetrazolium* e 0,04 g de forma reduzida de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH).

Relativamente à aferição dos resultados, esta teve por base a experiência obtida em músculo humano. Assim, em tecido muscular humano, a técnica de ATPase 9,4 permite a diferenciação das

fibras musculares tipo I das fibras tipo II. Deste modo, as fibras do tipo I apresentam coloração cinzento claro e as fibras do tipo II tonalidade cinzento escuro (Costin-Kelly, 2008).

Já a técnica ATPase 4,6, para além de permitir a diferenciação das fibras tipo I e II, também tem capacidade para a subtipificação das fibras tipo II em IIA, IIB e IIC. Neste caso, as fibras musculares tipo I devem apresentar cor cinzento muito escuro, enquanto as fibras tipo II vão possuir diferentes tonalidades de cinzento, todas mais claras que as fibras tipo I. As fibras IIA são cinzento claro e as IIB são cinzento. Já as fibras IIC representam uma pequena percentagem das fibras musculares, têm menor dimensão que as outras e são cinzento escuro (Latorre et al., 1993).

Por outro lado, a técnica NADH diaforase, que identifica o retículo intermiofibrilhar, forma uma rede azulada, de distribuição uniforme, por toda a célula muscular. Normalmente, obtém-se um padrão em “tabuleiro de xadrez”, de fibras mais escuras (tipo I) e mais claras (tipo II) (Costin-Kelly, 2008; Sundaram & Uppin, 2012).

Posteriormente, utilizando os resultados obtidos pela técnica ATPase 9,4, foi feita a contagem de fibras musculares do tipo I e do tipo II. Para esta contagem foi utilizado o programa *Image J*, recorrendo ao *plug in Cell Counter* criado por Kurt de Vos da Unidade Académica de Neurologia da Universidade de Sheffield em South Yorkshire, Inglaterra. A contagem foi efetuada utilizando, para cada músculo, cinco fotografias tiradas em microscópio Olympus BX com câmara fotográfica digital Olympus DP21 de diferentes zonas da amostra. A objetiva utilizada foi a de 10x que, juntamente com a ocular de 10x, permitiu uma ampliação total de 100 vezes.

3.2.3. Técnicas de imunohistoquímica

A imunohistoquímica foi primeiramente realizada nas amostras recolhidas do canídeo A. Só depois de garantir que a recuperação antigénica e a diluição dos anticorpos foram as corretas, é que procedeu à realização da técnica nas amostras do canídeo B e em três biópsias de canídeos diagnosticados com patologia muscular. Foi igualmente efetuado um controlo negativo, cuja incubação foi feita com PBS (soro fisiológico tamponado, pH 7,2 a 7,4) em substituição do anticorpo primário, de maneira a garantir uma maior fiabilidade dos resultados.

Para o canídeo A e B foram utilizadas as amostras dos músculos referidas anteriormente (temporal, masséter, diafragma e bíceps femoral). Para o caso clínico I e II, foram usadas amostras do músculo masséter. Para o caso III, as amostras pertenciam a um músculo do membro anterior e um do membro posterior (não foram especificados quais).

Seguidamente foram efetuados cortes, com cerca de 3 µm, no micrótomo Leica RM 2135® (*Leica Microsystems*, Nusslock, Alemanha), posteriormente montados em lâminas adesivadas Superfrost® Plus (*Thermo Scientific*, Massachusetts, Estados Unidos da América). Estas lâminas foram colocadas em estufa a 64 °C durante 1 hora e, de seguida, numa outra estufa a 37 °C *overnight*, de forma a garantir uma melhor aderência do corte à lâmina.

Os anticorpos primários utilizados, neste estudo, foram o antimiosina de cadeia pesada, isoforma lenta (MHC-*slow*) e a isoforma rápida (MHC-*fast*). São ambos monoclonais e encontram-se caracterizados na Tabela 2.

É igualmente importante referir que, por limitações financeiras e técnicas, foi necessário selecionar criteriosamente os anticorpos utilizados no presente trabalho. O anticorpo MHC-*fast* foi selecionado por ser utilizado em medicina humana, mais concretamente, no Laboratório de Neuropatologia do Serviço de Neurologia do Hospital de Santa Maria. Já o anticorpo MHC-*slow* foi selecionado com base no trabalho publicado por Štrbenc et al. (2006), uma vez que demonstrou ter a reação cruzada com as isoformas do MHC do músculo canino.

Anticorpo Primário	Origem	Clone	Referência	Isotipo	Espécie Imunizada
MHC- <i>slow</i>	Chemicon®	NOQ7.5.4D	MAB1628	IgG	Murganho
MHC- <i>fast</i>	Sigma®	MY-32	M 4276	IgG1	Murganho

Tabela 2 - Caracterização dos anticorpos primários utilizados.

A técnica histoquímica foi realizada recorrendo ao *kit* Novocastra® Novolink® Max Polymer Detection System (*Leica Byosystems*, Wetzlar, Alemanha), de acordo com o protocolo disponível no Anexo V.

Para as amostras dos músculos temporal, masséter, diafragma e bicípede femoral dos canídeos A e B e dos casos clínicos I, II e III foi feita a contagem do número de células marcadas com cada um destes anticorpos. Para tal foram aplicados os mesmos meios utilizados para a contagem de células já referidos a propósito das técnicas histoquímicas.

4. Resultados

4.1. Técnica histológica de rotina

A coloração de rotina H&E foi efetuada em cortes de congelação (Figura 10A) e em amostras de músculo fixadas em formol tamponado a 10% (Figura 10B). Com ambas as técnicas foi possível observar a normal histologia do tecido muscular.

Em corte transversal, verificou-se a presença de grupos, ou fascículos, de fibras musculares de formato poligonal, todas de tamanho uniforme e com o núcleo situado à periferia. Em corte longitudinal, foi possível observar que as células musculares, agora com formato cilíndrico, mantinham a estriação transversal.

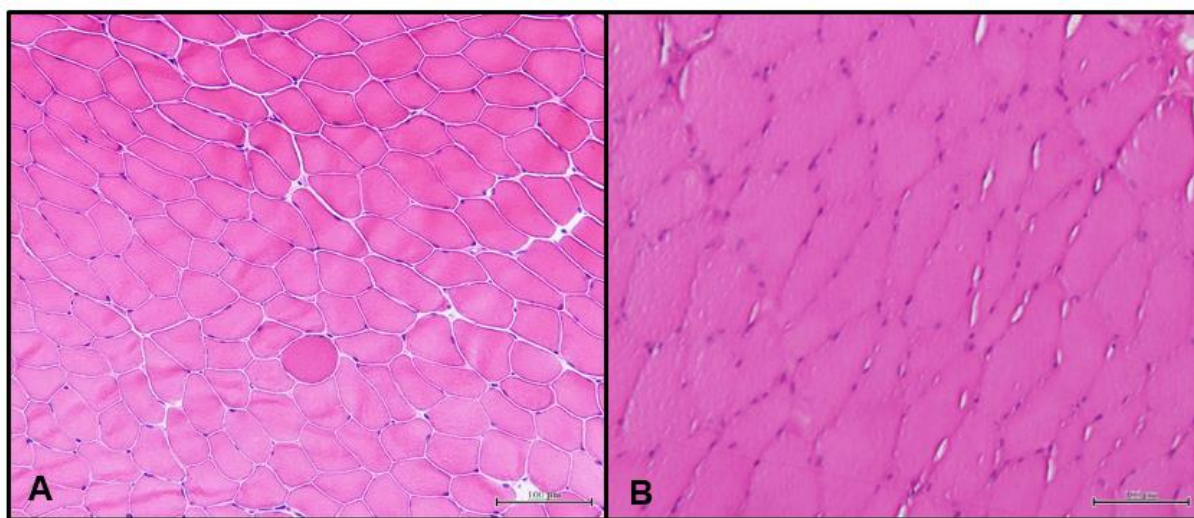


Figura 10 – H&E em cortes de congelação (A) e em amostras fixadas em formol tamponado a 10% (B), ambas pertencentes ao músculo temporal (ampliação x 100).

4.2. Técnicas de histoquímica

Com a técnica ATPase 9,4 foi possível a diferenciação das fibras musculares tipo I (cinzento claro) e tipo II (cinzento escuro). Em relação à técnica ATPase 4,6, recorrendo à otimização do pH da solução de pré-incubação para 4,45, conseguiu-se diferenciar as fibras tipo I (cinzento escuro) das tipo II e subtipificar as fibras tipo II em IIA (cinzento claro) e IIDog (cinzento), na maioria dos músculos analisados. Não foram encontradas fibras IIC em nenhum dos músculos analisados. As Figuras 11 e 12 permitem ilustrar os resultados obtidos para cada músculo analisado.

Na Tabela 3 estão indicados não só os tipos de fibras musculares detetados consoante o músculo e a técnica ATPase utilizada, mas também os resultados obtidos pela técnica NADH diaforase. Com esta técnica os resultados obtidos foram muito diferentes entre os músculos mastigadores e os restantes. As diferenças encontraram-se principalmente na distribuição uniforme, ou não, da marcação azulada por toda a fibra muscular e na quantidade de células azuis escuras (tipo I) e azuis claras (tipo II).

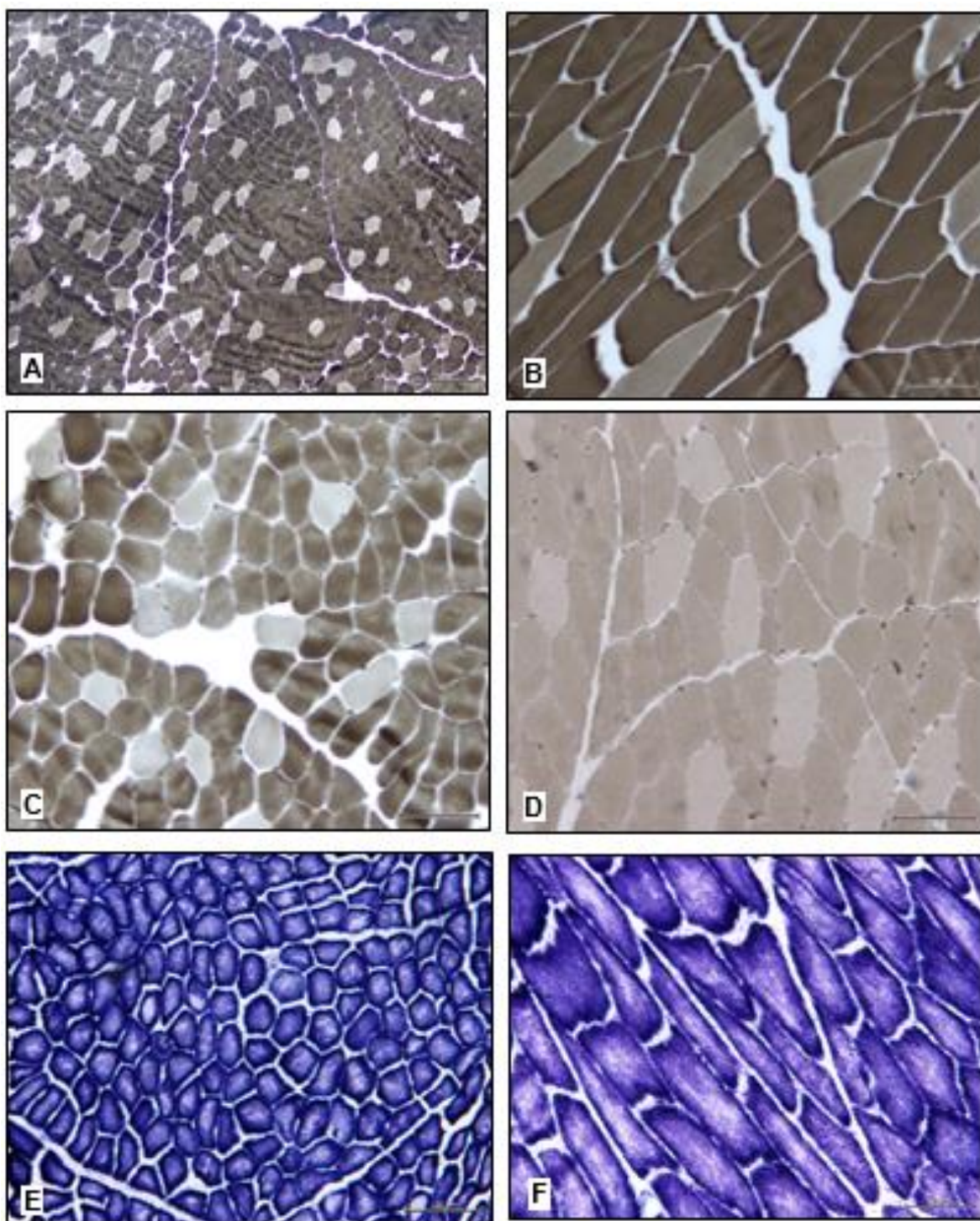


Figura 11 - Técnicas histoquímicas realizadas nos músculos temporal e masséter.

A, B - ATPase 9,4 no músculo temporal (A) e no masséter (B). A técnica permitiu diferenciar as fibras musculares tipo I (cinzento claro) das tipo II (cinzento escuro). C, D - ATPase 4,6 no músculo temporal (C) e no masséter (D). A técnica possibilitou a diferenciação no temporal em três tipos de fibras musculares (I - cinzento escuro, IIA - cinzento claro e IIDog - cinzento), enquanto no masséter apenas se diferenciaram as fibras tipo I das tipo II. E, F - NADH diaforase no músculo temporal (E) e no masséter (F). Nesta técnica foi observado, em ambos os músculos, uma marcação azulada intensa, mais intensa na região subsarcolémica, em quase todas as fibras musculares.

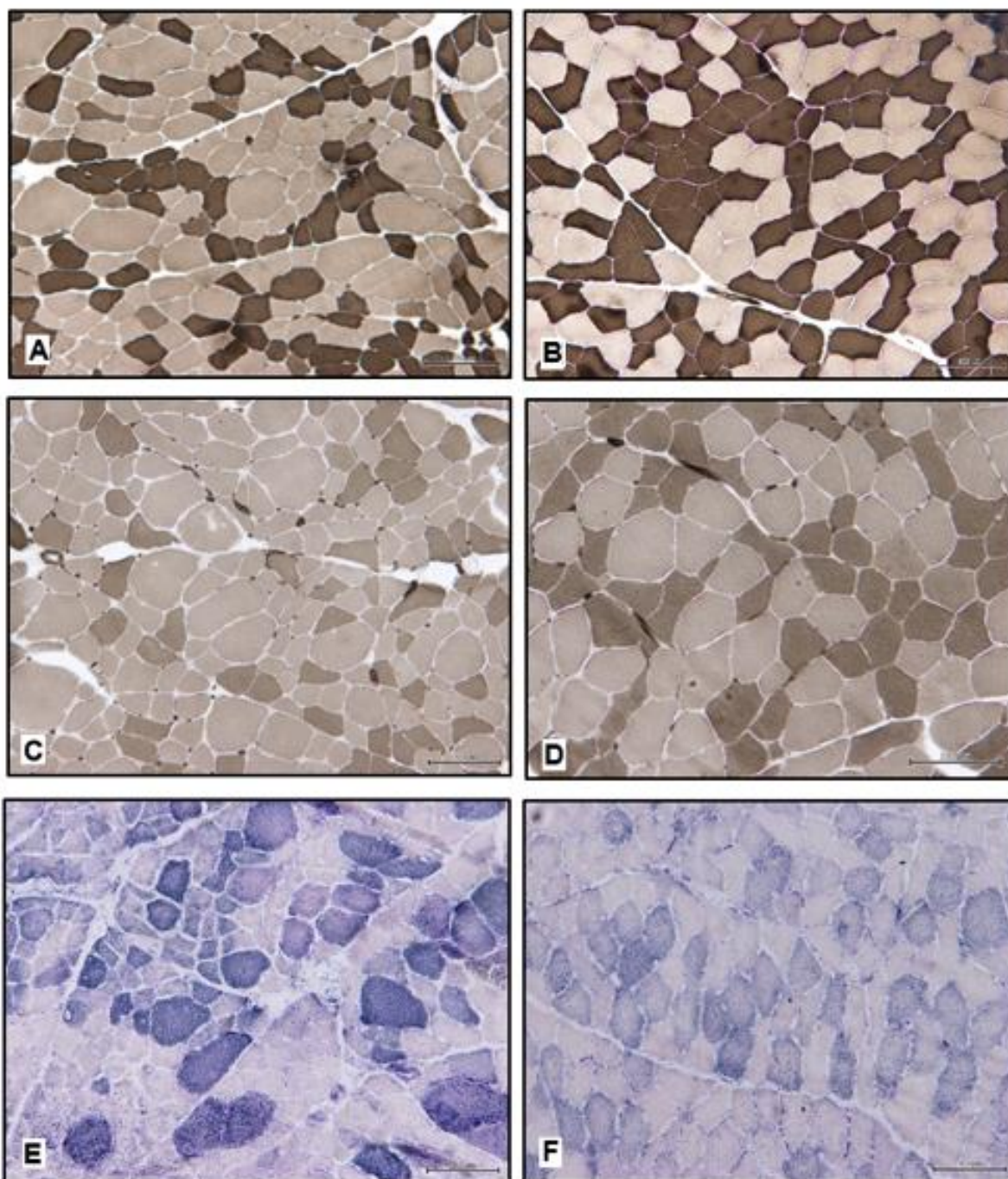


Figura 12 - Técnicas histoquímicas realizadas no diafragma e no bíceps femoral.

A, B – ATPase 9,4 no músculo diafragma (A) e bíceps femoral (B). A técnica permitiu diferenciar as fibras musculares tipo I (cinzento claro) das tipo II (cinzento escuro). B, C - ATPase 4,6 no diafragma (C) e bíceps femoral (D). A técnica possibilitou a diferenciação em três tipos de fibras musculares (I – cinzento escuro, IIA – cinzento claro e IIDog – cinzento). E, F - NADH diaforase no diafragma (E) e bíceps femoral (F). Foi observada um ponteados azulados de distribuição uniforme em metade, no caso do bíceps femoral, ou menos de metade das fibras musculares no diafragma.

Músculo	ATPase 9,4	ATPase 4,6	NADH diaforase
Temporal	Fibras tipo I e II.	Fibras tipo I, IIA e IIDog.	Marcação azulada intensa, mais intensa na região subsarcolémica, na maioria das fibras musculares.
Masséter	Fibras tipo I e II.	Fibras tipo I e II.	Marcação azulada intensa, mais intensa na região subsarcolémica, em quase todas as fibras musculares.
Diafragma	Fibras tipo I e II.	Fibras tipo I, IIA e IIDog.	Presença de ponteados azulados, de distribuição uniforme, em menos de metade das fibras musculares, desenhando uma rede, que corresponderá ao retículo intermiofibrilar.
Bicípede Femoral	Fibras tipo I e II.	Fibras tipo I, IIA e IIDog.	Presença de ponteados azulados, de distribuição uniforme, em cerca de metade das células musculares.

Tabela 3 - Resultados obtidos nas técnicas ATPase 4,6, 9,4 e NADH diaforase, para os diferentes músculos analisados (temporal, masséter, diafragma e bicípede femoral).

Com a correta diferenciação entre as fibras musculares tipo I e II pela técnica ATPase 9,4 foi possível efetuar a contagem das mesmas nos vários músculos selecionados (Tabela 4). A contagem detalhada dos vários músculos, por campos, encontra-se disponível no Anexo VI.

Músculo	Fibras musculares tipo I	Fibras musculares tipo II
Temporal	14,89 %	85,11 %
Masséter	19,26 %	80,74 %
Diafragma	62,52 %	37,48 %
Bicípede Femoral	37,26 %	62,74 %

Tabela 4 - Contagem do número de fibras musculares do tipo I e II, nos vários músculos selecionados, recorrendo à técnica ATPase 9,4.

4.3. Técnicas de imunohistoquímica

Em todas as amostras de músculo analisadas dos canídeos A e B obteve-se um resultado positivo nas marcações com ambos os anticorpos utilizados. Consoante o músculo e anticorpo em questão a quantidade de células marcadas apresentou grandes variações, tendo sido por isso efetuada a contagem de células marcadas por cada anticorpo. Assim, as Tabelas 5 e 6 mostram, para os canídeos A e B, respetivamente, a percentagem de células com marcação para os anticorpos MHC-*slow* e MHC-*fast* consoante o músculo analisado (Anexo VII e VIII).

Músculo	Células marcadas (MHC-slow)	Células marcadas (MHC-fast)
Temporal	1,85 %	3,51 %
Masséter	16,29 %	17,72 %
Diafragma	58,97 %	57,82 %
Bicípede Femoral	46,25 %	58,29 %

Tabela 5 - Percentagem (%) de células marcadas pelos anticorpos MHC-slow e MHC-fast, em vários músculos do canídeo A.

Músculo	Células marcadas (MHC-slow)	Células marcadas (MHC-fast)
Temporal	26,18 %	21,03 %
Masséter	19,09 %	16,82 %
Diafragma	67,66 %	42,88 %
Bicípede Femoral	51,65 %	55,57 %

Tabela 6 - Percentagem (%) de células marcadas pelos anticorpos MHC-slow e MHC-fast, em vários músculos do canídeo B.

Tanto com o anticorpo MHC-slow, como com o MHC-fast foi possível observar que, no músculo temporal, os resultados são os mais díspares, apresentando o canídeo A marcação de fibras musculares inferior a 5% enquanto no canídeo B, a marcação de células atingiu valores entre os 20% e 30%. No entanto, para o músculo masséter a marcação foi sempre inferior a 20%. Já para os músculos diafragma e bicípede femoral, de ambos os canídeos, obteve-se marcação em mais de 40% das células musculares, Figuras 13 a 20.

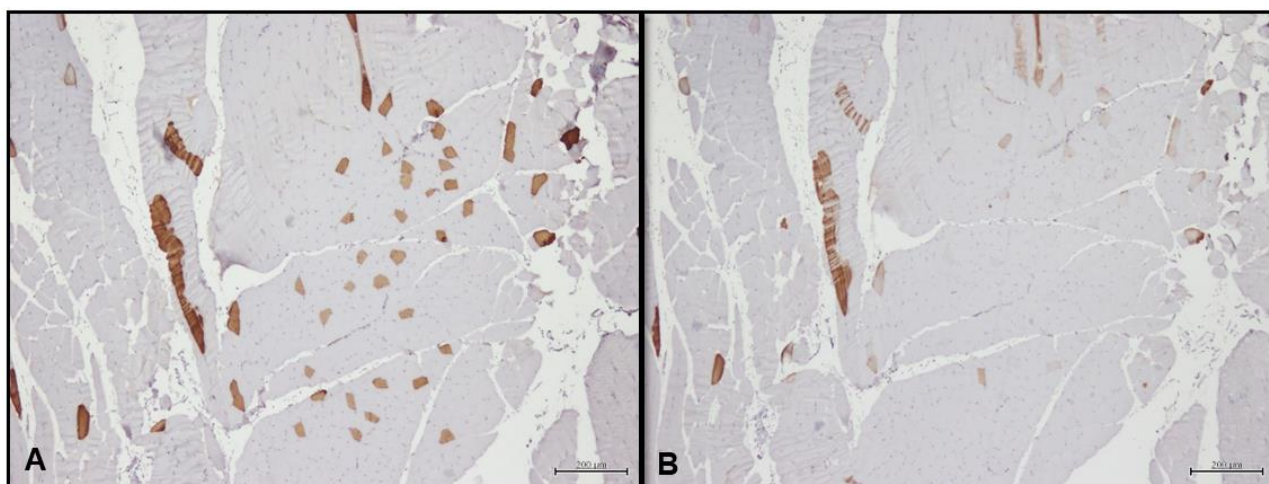


Figura 13 - Imunomarcção com os anticorpos MHC-slow (A) e MHC-fast (B) no músculo temporal do canídeo A (ampliação x 40). A maior parte das fibras não marcou com qualquer dos anticorpos.

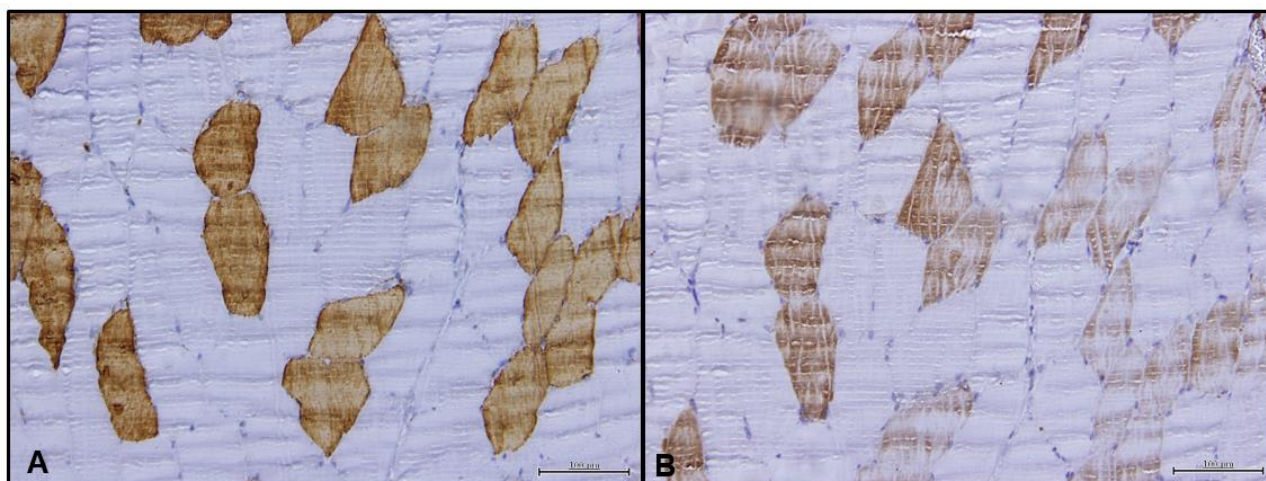


Figura 14 - Imunomarcação com os anticorpos MHC-*slow* (A) e MHC-*fast* (B) no músculo temporal do canídeo B (ampliação x 100).

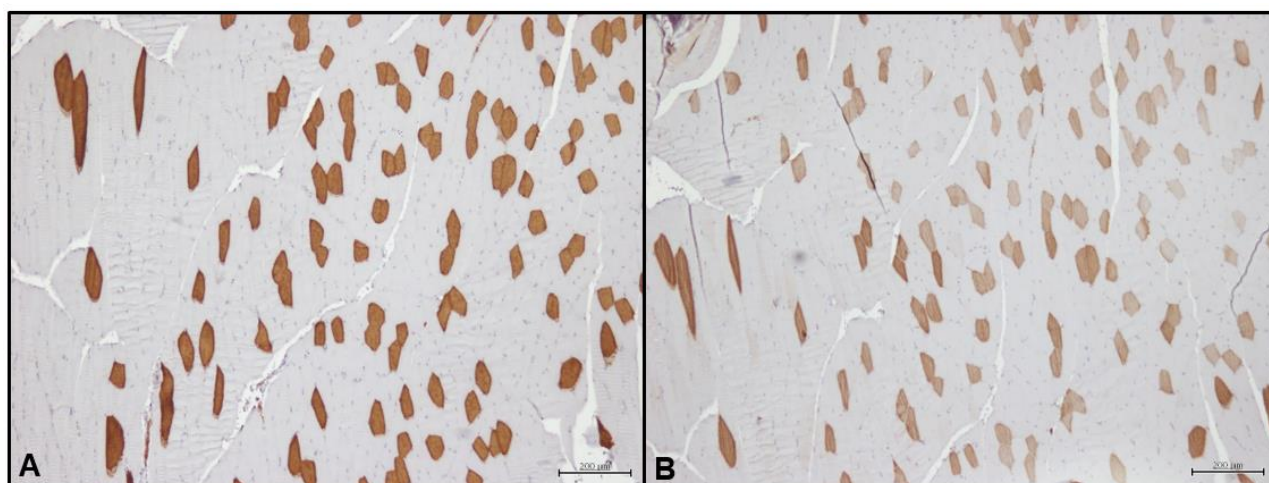


Figura 15 - Imunomarcação com os anticorpos MHC-*slow* (A) e MHC-*fast* (B) no músculo masséter do canídeo A (ampliação x 40).

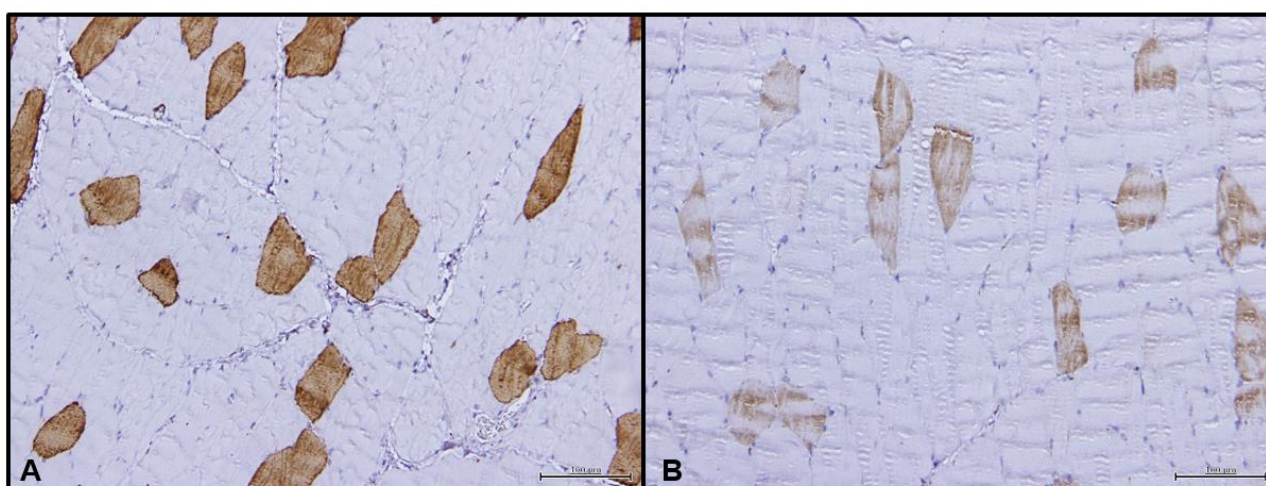


Figura 16 - Imunomarcação com os anticorpos MHC-*slow* (A) e MHC-*fast* (B) no músculo masséter do canídeo B (ampliação x 100).

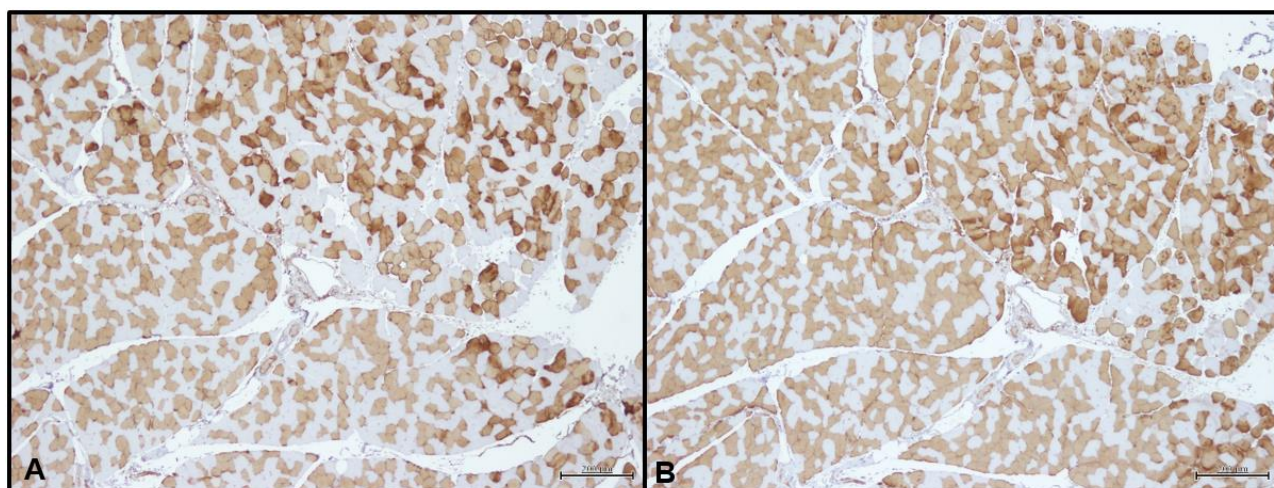


Figura 17 - Imunomarcação recorrendo aos anticorpos MHC-*slow* (A) e MHC-*fast* (B) no diafragma do canídeo A (ampliação x 40).

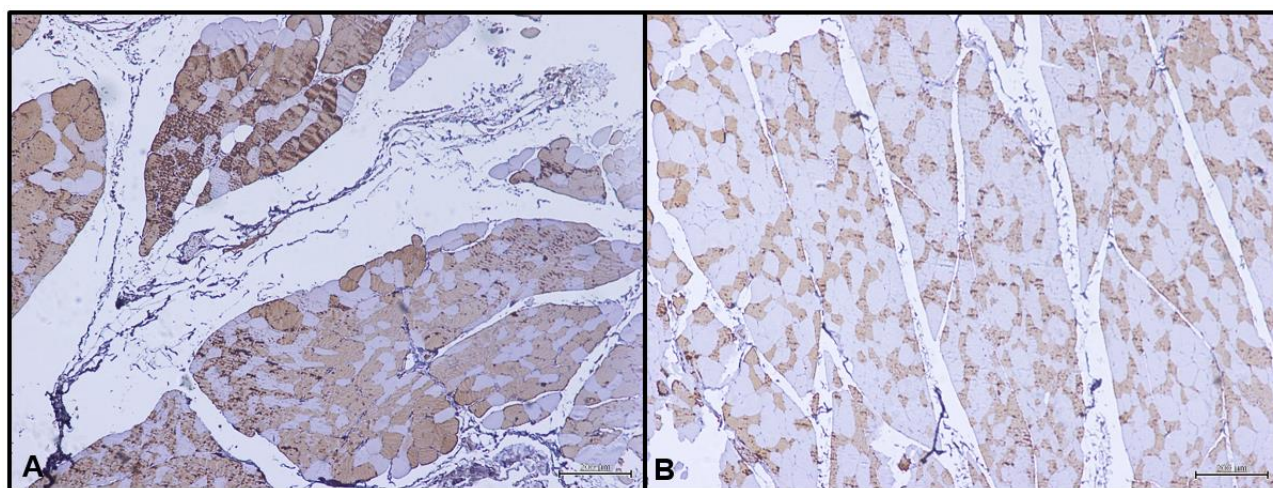


Figura 18 - Imunomarcação recorrendo aos anticorpos MHC-*slow* (A) e MHC-*fast* (B) no diafragma do canídeo B (ampliação x 40).

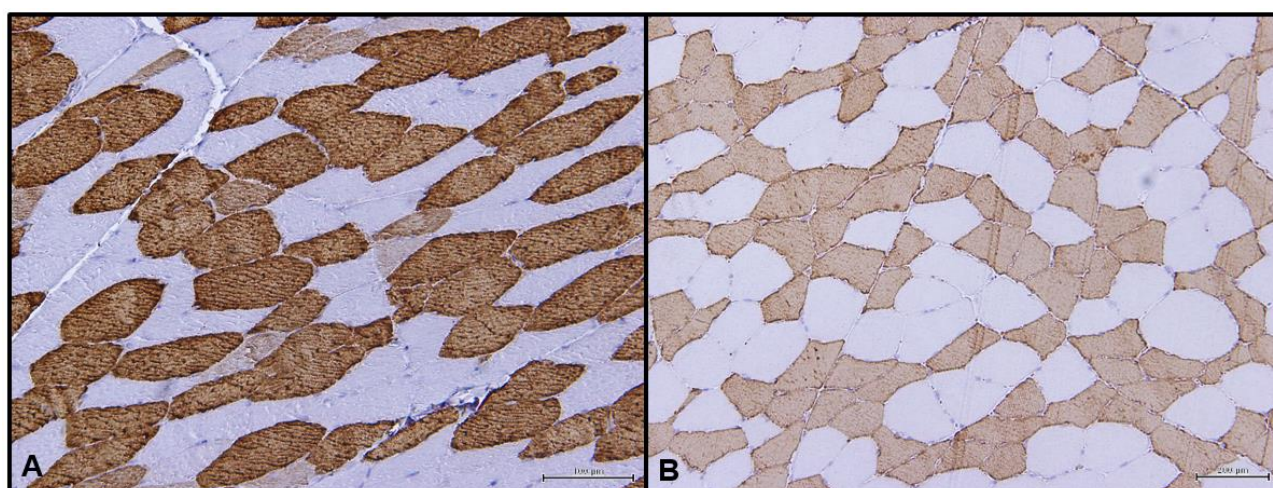


Figura 19 - Imunomarcação com os anticorpos MHC-*slow* (A) e MHC-*fast* (B) no músculo bicípede femoral do canídeo A (ampliação x 100).

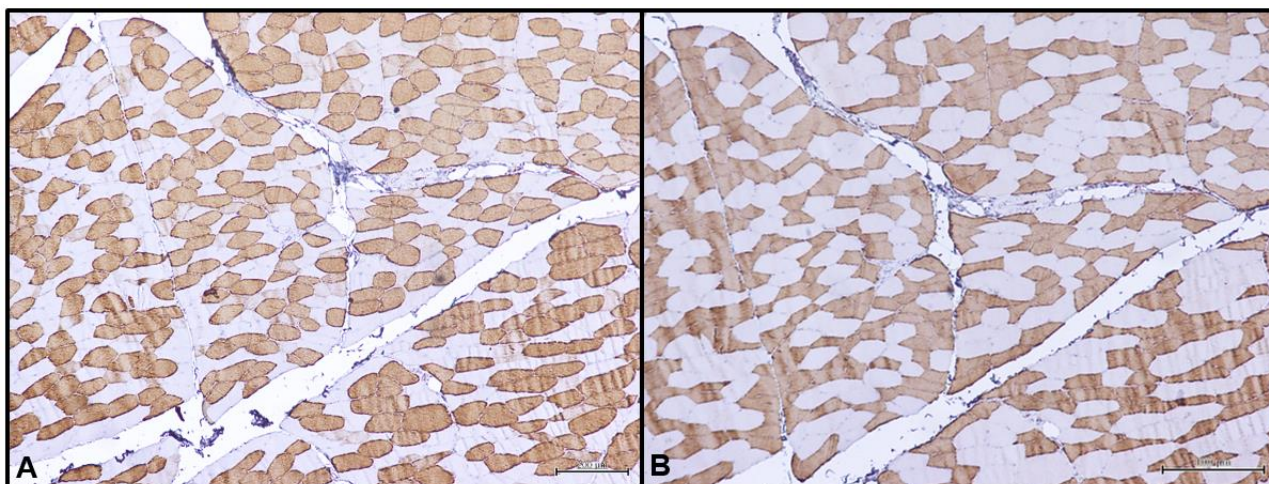


Figura 20 - Imunomarcação com os anticorpos MHC-*slow* (A) e MHC-*fast* (B) no músculo bíceps femoral do canídeo B (ampliação x 40).

Nas figuras anteriores também é possível observar que a intensidade de marcação varia consoante o músculo e o anticorpo primário utilizado. Sendo assim, a Tabela 7 indica quais foram as diferentes intensidades de marcação para cada músculo selecionado dos dois canídeos.

Canídeo A		
Músculo	Intensidade de marcação *	
	MHC- <i>slow</i>	MHC- <i>fast</i>
Temporal	++ / +++	+ / ++
Masséter	+++	+
Diafragma	++ / +++	++ / +++
Bíceps Femoral	+++	++
Canídeo B		
Músculo	Intensidade de marcação *	
	MHC- <i>slow</i>	MHC- <i>fast</i>
Temporal	++ / +++	+
Masséter	++ / +++	+ / ++
Diafragma	++ / +++	++ / +++
Bíceps Femoral	+++	+++

Tabela 7 - Intensidade de marcação geral para o MHC-*slow* e o MHC-*fast* nos vários músculos (temporal, masséter, diafragma e bíceps femoral) dos canídeos A e B.

Nota: *Intensidade de marcação: +++ = marcação forte; ++ = marcação moderada; + = marcação fraca.

4.4. Casos clínicos de doença muscular

4.4.1. Caso clínico I

O caso clínico I corresponde a um canídeo macho com 7 anos de idade e da raça Labrador Retriever. Do material recebido pelo Laboratório VetPat constavam três fragmentos de biópsia do músculo masséter, com 0,8, 0,5 e 0,3 cm. Não foram fornecidas informações quanto aos sinais clínicos demonstrados pelo paciente.

Ao exame histológico de rotina (Figura 21), o fragmento de 0,8 cm revelava atrofia e irregularidade do perfil das fibras musculares, com marcada hipertrofia dos núcleos, os quais se apresentavam ocasionalmente no centro das fibras. Surgiram com frequência áreas com perda de estriação. Foi também possível observar marcada hemorragia intersticial do tecido fibroso envolvente (ectomísio). Já o fragmento médio apresentava alterações cromáticas de algumas fibras, com aumento da eosinofilia, persistência da estriação transversal e irregularidade do perfil. Por fim, o fragmento mais reduzido era maioritariamente constituído por tecido conjuntivo fibroso rico em células adiposas, no qual se inseriam raros feixes musculares com alterações cromáticas de algumas fibras, com aumento da eosinofilia, perda de estriação transversal e irregularidade do perfil.

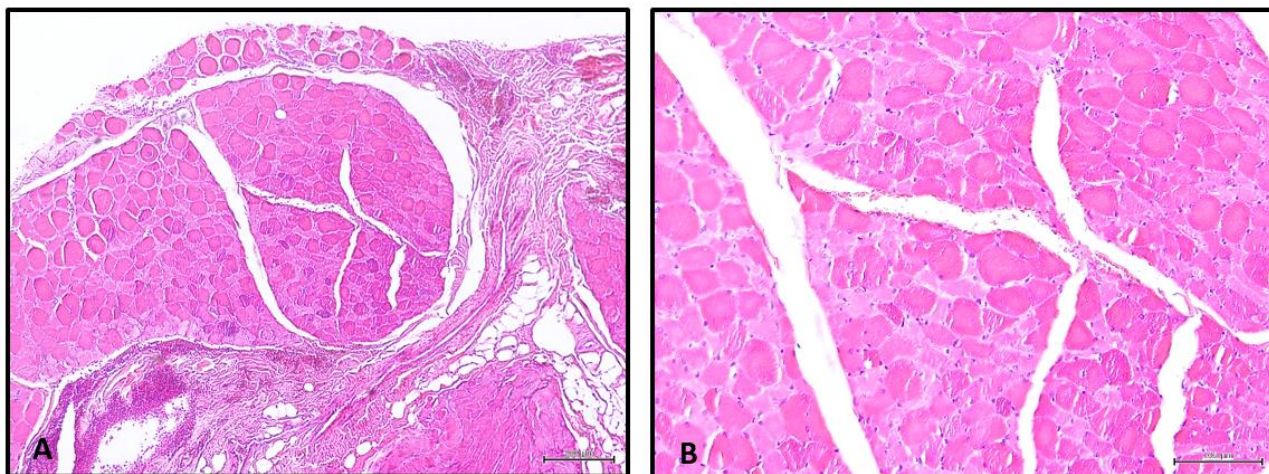


Figura 21 - Caso clínico I – Cão. Masséter. A - Áreas com perda de estriação, atrofia e irregularidade do perfil de algumas fibras musculares e aumento da eosinofilia das mesmas (H&E, x 40). B – Detalhe ampliado (H&E, x 100).

Com base neste exame microscópico, que revelava imagens de regeneração das fibras musculares, em particular no fragmento maior, foi possível verificar que estaria em curso um *processo degenerativo dos músculos mastigadores*. Contudo, o presente diagnóstico deveria ser avaliado à luz da história clínica.

4.4.2. Caso clínico II

O caso clínico II refere-se a um canídeo macho com 4 anos de idade, da raça *Basset Hound*. Sabe-se que este apresentava dificuldade em abrir a boca. O Laboratório VetPat recebeu três fragmentos de biópsia de músculo masséter, com o eixo maior variando entre 1,5 e 0,3 cm e um linfonodo mandibular, com 2,0 x 1,5 x 0,4 cm.

Ao exame histológico de rotina (Figura 22), o maior fragmento de tecido enviado correspondia a tecido conjuntivo laxo com edema marcado e, numa das margens, faixas de fibras musculares estriadas. Parte destas fibras musculares apresentavam forte eosinofilia do citoplasma, indicativa de degenerescência, e núcleos picnóticos em posição central. Quanto ao fragmento mais pequeno enviado, este correspondia a glândula salivar puramente serosa, sem alterações significativas. Já o terceiro fragmento era constituído por tecido muscular estriado, com substituição de um vasto número de fibras (cerca de 80%) por células adiposas bem diferenciadas. Parte das células musculares remanescentes exibia eosinofilia do citoplasma e picnose dos núcleos. Não foram identificados agentes microbianos, nem células neoplásicas. Por outro lado, o linfonodo recebido exibia congestão moderada e alguns pequenos focos de hemorragia; hiperplasia das células reticulares, com retenção de escasso pigmento hemático. O tecido linfoide apresentava discreta hiperplasia. Não se identificaram agentes microbianos.

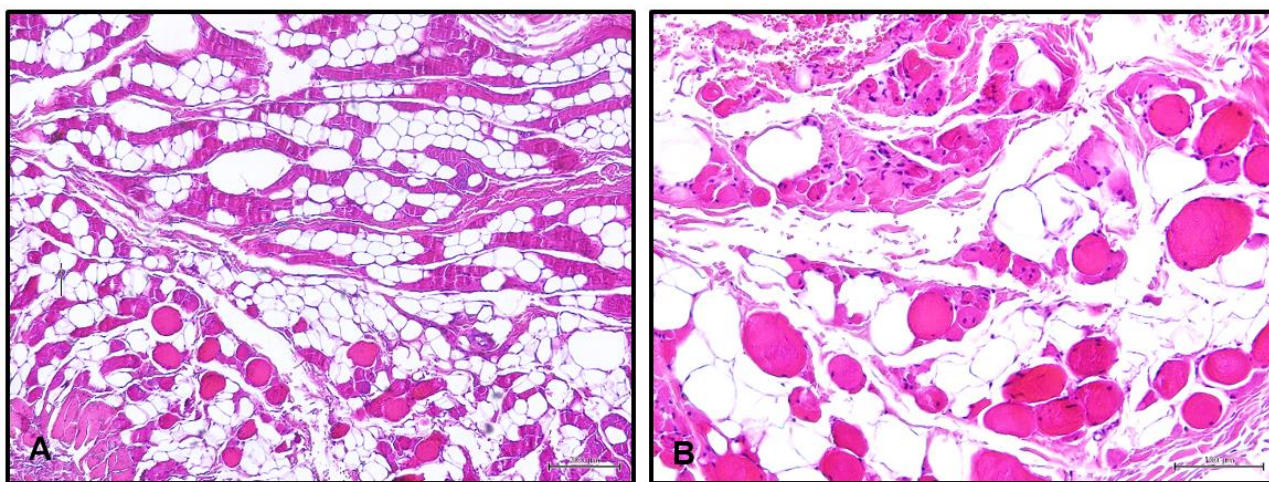


Figura 22 - Caso clínico II – Cão. Masséter. A - Substituição de tecido muscular por células adiposas bem diferenciadas. Parte das células musculares remanescentes exhibe eosinofilia do citoplasma e picnose dos núcleos (masséter, H&E, x 40). B - Para além da substituição do tecido muscular por células adiposas, também é possível observar, nas células musculares, uma marcada eosinofilia do citoplasma e núcleos picnóticos em posição central (masséter, H&E, x 100).

Com base neste exame microscópico, conclui-se estar-se perante uma *lipomatose dos músculos mastigadores*, associada ou decorrente da degenerescência dos mesmos. Há possibilidade de esta patologia poder corresponder a sequela de *miosite dos músculos mastigadores* (MMM). É importante ter em conta que o processo poderia vir a sofrer algum agravamento, atendendo a que ainda estavam em curso alterações degenerativas dos músculos afetados. Quanto ao linfonodo, verificou-se uma hiperplasia das células reticulares, possivelmente, em resposta à inflamação dos tecidos tributários.

4.4.3. Caso clínico III

O caso clínico III refere-se a um canídeo macho de raça indeterminada e com 5 anos de idade. Ao Laboratório VetPat chegaram dois fragmentos de biópsia de músculo do membro anterior e membro

posterior, ambos com 1,5 x 1 x 0,5 cm. Foram igualmente enviados fragmentos de biópsia do músculo temporal para os Serviços de Patologia do Departamento de Patobiologia da FMV da Universidade de Utrecht, na Holanda. Sabe-se que os sinais clínicos deste canídeo tiveram início na região da cabeça mas que depois progrediram para os membros. Os valores de CK estavam também aumentados.

No exame histológico de rotina, o fragmento de tecido muscular do membro torácico revelava necrose de fibras individuais, isoladas e dispersas ou organizadas em pequenos grupos, as quais se apresentavam com diâmetro aumentado, perfil arredondado ao corte transversal e marcada acidofilia. As fibras atingidas evidenciavam perda da estriação transversal. Ocasionalmente, identificaram-se pequenos feixes de fibras igualmente afetadas por acidofilia e perda de estriação. Foi ainda observada fibrose envolvendo um feixe de fibras afetadas. Não foram identificados agentes microbianos. No caso do fragmento pertencente a um músculo do membro pélvico, as lesões eram idênticas às descritas para a amostra do membro anterior, embora a sua expressão fosse menos intensa. Identificou-se um único foco de regeneração das fibras musculares, com presença de núcleos em posição central e discreto infiltrado inflamatório à periferia. Aqui também não foram identificados agentes microbianos.

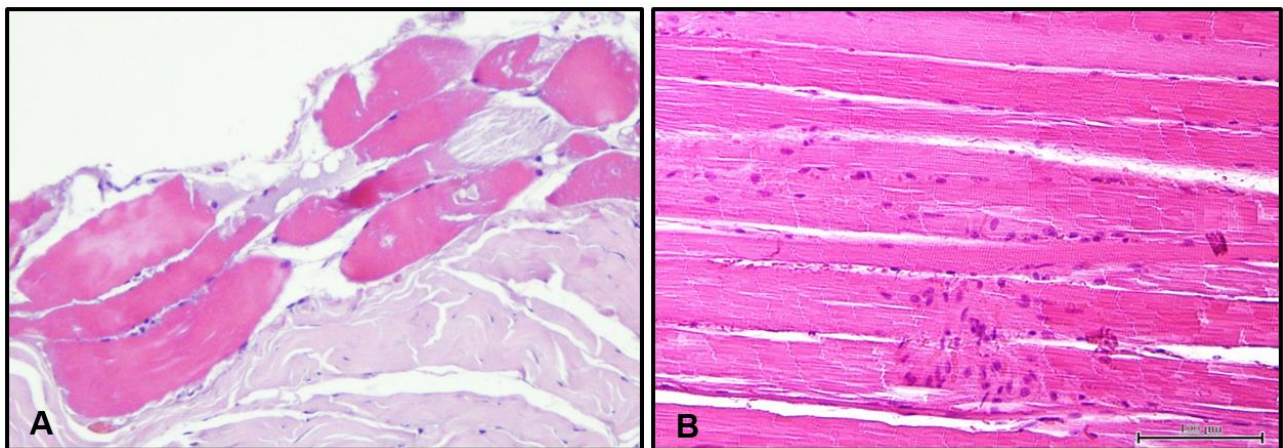


Figura 23 – Caso clínico III – Cão. Membro Anterior (A) e Membro Posterior (B). A – Necrose das fibras musculares, que apresentam aumento de diâmetro e marcada eosinofilia (H&E, x 100). B – Presença de vários mionúcleos centrais e perda da estriação transversal (H&E, x 100).

Com base nestes achados microscópicos, concluiu-se que estaria em curso um processo de *necrose de fibras musculares*, individual ou segmentar, afetando feixes de fibras isoladas, sem que sejam evidentes imagens de regeneração. As lesões pareciam ser mais graves no membro anterior, embora a diferença para o músculo do membro posterior fosse moderada. A aparente deficiente capacidade de regeneração poderia pôr em risco a recuperação dos músculos atingidos.

Quanto às biópsias de músculo temporal, estas revelaram edema moderado a marcado, hipereosinofilia, hialinização e fragmentação das fibras musculares, consistente com degenerescência e necrose. Não foi observada a presença marcada de fibrose e só ocasionalmente é que se verificou infiltração com células semelhantes a macrófagos, sugerindo estar em curso

inflamação subaguda. Em suma, conclui-se que as alterações morfológicas nestas fibras musculares eram inespecíficas e refletiam limitada capacidade de resposta do músculo estriado. Desta forma, não foi possível determinar qual a etiologia específica da doença em questão e, apesar dos sinais clínicos terem tido início na região da cabeça, a histologia não foi sugestiva de MMM, porque não se verificou infiltrado linfocítico significativo nas biópsias do músculo temporal.

É de referir que este canídeo melhorou significativamente com corticoterapia, tendo também os valores de CK diminuído. A evolução estabilizou com terapêutica com dose baixa de prednisolona (0,15 mg/Kg SID).

4.4.4. Imunohistoquímica

Para as amostras de músculo dos casos clínicos I, II e III foi feita a contagem do número de células marcadas com cada um dos anticorpos utilizados na técnica de imunohistoquímica (Anexo IX). A Tabela 8 mostra a percentagem de células com marcação para os anticorpos MHC-*slow* e MHC-*fast*, consoante o caso clínico em questão.

Caso Clínico	Células marcadas (MHC- <i>slow</i>)	Células marcadas (MHC- <i>fast</i>)
I – Masséter (processo degenerativo dos MM)	36,19 %	66,38 %
II – Masséter (lipomatose dos MM)	55,44 %	79,67 %
III – MA e MP (necrose das fibras musculares)	MA = 22,22 % MP = 32,99 %	MA = 90,22 % MP = 77,32 %

Tabela 8 - Percentagem (%) de células marcadas pelos anticorpos MHC-*slow* e MHC-*fast*, nos músculos dos casos clínicos I, II e III.

Nota: MA = membro anterior, MM = músculos mastigadores, MP = membro posterior.

É possível verificar que, em todas as amostras de músculo dos casos clínicos, se destacou a presença de maior percentagem de marcação para o anticorpo MHC-*fast* (Figuras 24 a 27).

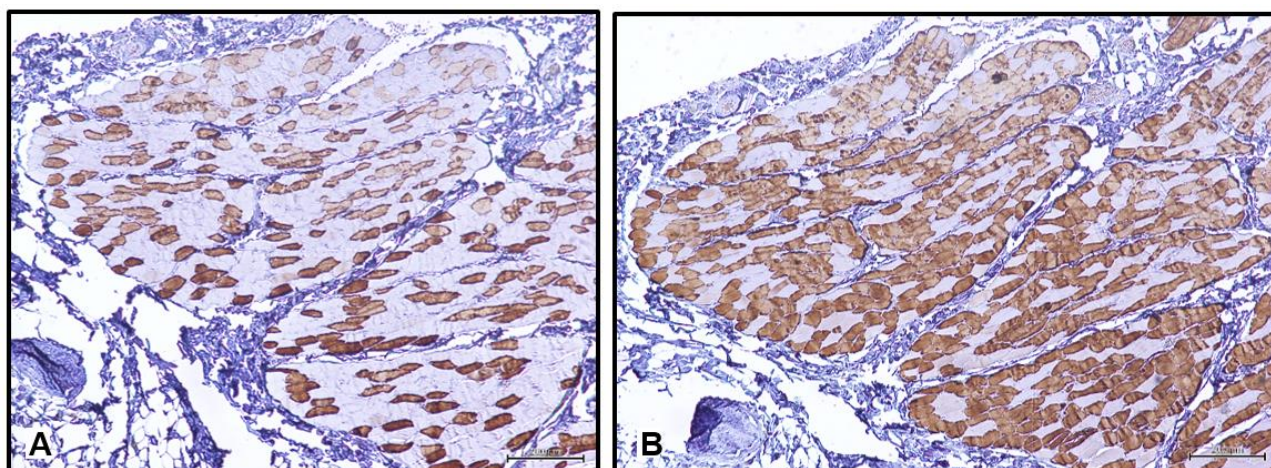


Figura 24 - Caso clínico I: imunomarcação com os anticorpos MHC-*slow* (A) e MHC-*fast* (B) no masséter de um canídeo diagnosticado com processo degenerativo dos músculos mastigadores (ampliação x 40).

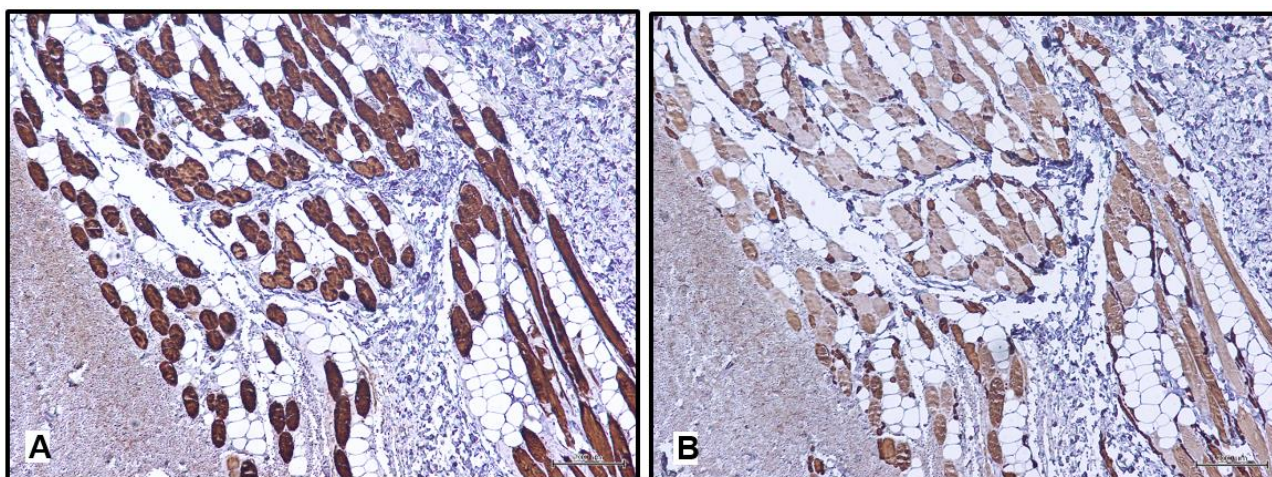


Figura 25 - Caso clínico II: imunomarcac o com os anticorpos MHC-*slow* (A) e MHC-*fast* (B) no masséter de um canídeo com lipomatose dos músculos mastigadores (amplia o x 40).

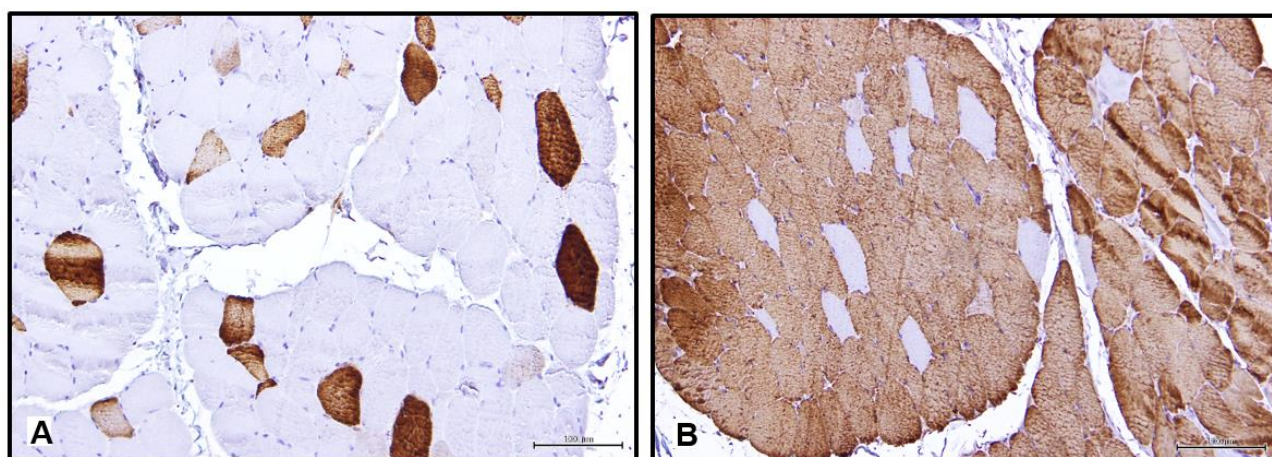


Figura 26 - Caso clínico III: imunomarcac o com os anticorpos MHC-*slow* (A) e MHC-*fast* (B) num músculo do membro anterior de um canídeo com necrose das fibras musculares (amplia o x 100).

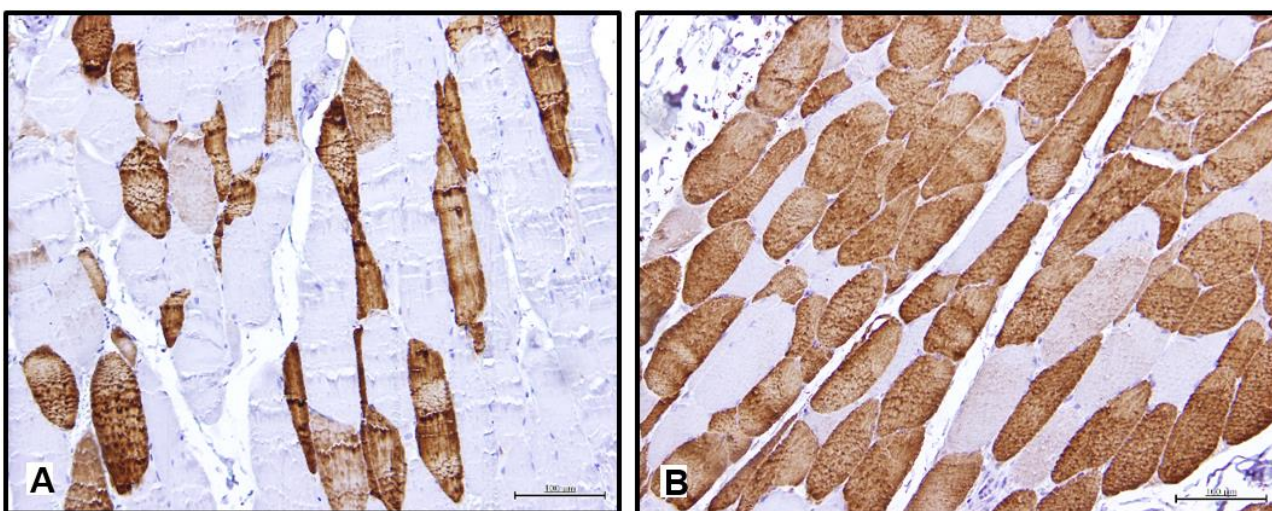


Figura 27 - Caso clínico III: imunomarcac o com os anticorpos MHC-*slow* (A) e MHC-*fast* (B) num músculo do membro posterior de um canídeo com necrose das fibras musculares (amplia o x 100).

No caso clínico I foi possível verificar que houve aumento da percentagem de fibras musculares tipo I, comparando com os valores obtidos na histoquímica e imunohistoquímica para o masséter. Relativamente às fibras musculares tipo II verifica-se que há uma diminuição da percentagem de fibras marcadas (66%) quando comparando com os 81% deste tipo de fibras marcadas na técnica ATPase 9,4. Estes resultados sugerem poder ter ocorrido destruição direcionada para as fibras tipo II, fazendo aumentar percentualmente o número de fibras tipo I. Comparando com os 16% a 17% de fibras tipo II marcadas na imunohistoquímica do músculo masséter, parece haver um aumento do número de fibras que expressa uma das isoformas *fast* do MHC.

No caso clínico II ocorreu exatamente o mesmo que no caso I em relação às fibras musculares tipo I. Contudo, para as fibras musculares tipo II, a percentagem obtida aproximou-se muito dos valores obtidos na histoquímica (80% de células marcadas). Quando comparado com os resultados da imunohistoquímica no masséter não patológico, há um aumento do número células marcadas pelo anticorpo MHC-*fast*.

Para o caso clínico III foram comparados os resultados dos músculos não especificados dos membros anterior e posterior com o bípède femoral. Neste caso, é a percentagem de fibras tipo I que se apresenta diminuída comparativamente aos resultados histoquímicos e imunohistoquímicos de músculo sem patologia. A diminuição ocorrida foi entre 15% a 29% para o músculo do membro anterior e entre 4% a 19% para o do membro posterior. Já nas fibras musculares tipo II verificou-se aumento médio de 31% no membro anterior, em comparação com os valores das técnicas histoquímicas e imunohistoquímicas efetuadas no bípède femoral. No caso do músculo do membro posterior, o aumento da percentagem de fibras tipo II foi de 18%. Neste caso clínico, parece verificar-se destruição direcionada para as fibras musculares tipo I, levando ao aumento percentual das fibras tipo II.

Em todos os casos clínicos foram observadas diversas intensidades de marcação. Sendo assim, a Tabela 9 indica quais foram as diferentes intensidades de marcação para cada um dos casos clínicos, consoante o anticorpo em questão.

Caso Clínico	Intensidade de marcação *	
	MHC- <i>slow</i>	MHC- <i>fast</i>
I (masséter)	++ / +++	++ / +++
II (masséter)	+++	++ / +++
III (membro anterior)	+ / ++ / +++	++ / +++
III (membro posterior)	+ / ++ / +++	+ / ++ / +++

Tabela 9 - Intensidade de marcação encontrada, para o MHC-*slow* e o MHC-*fast*, nos músculos dos casos clínicos I, II e III.

Nota: *Intensidade de marcação: +++ = marcação forte; ++ = marcação moderada; + = marcação fraca.

5. Discussão

As técnicas histoquímicas são essenciais para o estudo das biópsias musculares, tanto na medicina humana como na veterinária (Paciello & Papparella, 2009). Deste modo, no presente trabalho, foram realizadas as seguintes técnicas: ATPase 9,4, ATPase 4,6 e NADH-diaforase.

Relativamente à técnica ATPase 9,4 foi possível, em todos os músculos selecionados (temporal, masséter, diafragma e bicípede femoral), obter boa diferenciação entre as fibras musculares tipo I (cinzento claro) e tipo II (cinzento escuro). O resultado obtido está de acordo com a literatura existente, pela qual a reação ATPase (após uma pré-incubação recorrendo a uma solução de pH básico) permitiu a clara distinção entre as fibras de contração lenta (tipo I) e as fibras de contração rápida (tipo II) (Braund et al., 1982; Latorre et al., 1993; Snow et al., 1982; Štrbenc et al., 2006). Por seu lado, no caso da técnica ATPase 9,4 cujo pH ideal da solução de pré-incubação para músculo humano é de 10,2, verificou-se que a diferenciação entre as fibras musculares no cão era demasiado ténue. Com base na bibliografia consultada, o valor escolhido para o pH da solução de incubação foi 10,35 (Acevedo & Rivero, 2006; Latorre et al., 1993; Snow et al., 1982). Desta forma, obteve-se uma correta intensidade de marcação, com uma distinção clara entre as fibras musculares tipo I e tipo II.

Quanto às percentagens obtidas após a contagem de fibras musculares tipo I e II em cada músculo (recorrendo à técnica ATPase 9,4) foi possível verificar que os resultados obtidos se encontravam de acordo com a bibliografia. Segundo Shelton & Cardinet (1990), os músculos mastigadores são predominantemente compostos por fibras tipo II. As fibras tipo I, geralmente, só representam 10% a 20% do total das fibras musculares nestes músculos. No presente trabalho, também se verificou que o masséter apresentava, na sua constituição, 19,26% de fibras musculares tipo I e 80,74% do tipo II. Também o músculo temporal demonstrou apresentar percentagem de fibras tipo I (14,89%) e II (85,11%) semelhante à verificada por Shelton & Cardinet (1990) para os músculos mastigadores. Quanto ao diafragma, sabe-se que é um músculo utilizado de forma contínua e persistente, logo possuidor de um maior número de fibras tipo I (McGavin & Valentine, 2009). Com base num estudo efetuado por Davies & Gunn (1972), o diafragma da espécie canina tem 64% de fibras musculares tipo I e 36% das fibras tipo II. No presente trabalho, este músculo apresentou 62,52% de fibras tipo I e 37,26% de fibras tipo II, aproximando-se muito dos valores obtidos por Davies & Gunn (1972). Por fim, no músculo bicípede femoral obteve-se 37,26% de fibras tipo I e 62,74% de fibras tipo II. Estes valores estão muito próximos dos obtidos por Braund et al. (1982), que verificou que o bicípede femoral canino apresentava 41% de fibras tipo I e 59% de fibras tipo II. Armstrong, Saubert IV, Seeherman, & Taylor (1982) também relataram que o bicípede femoral teria entre 31% a 45% de fibras musculares do tipo I.

Apesar das fibras tipo I e II serem facilmente distinguíveis utilizando a técnica ATPase 9,4, a separação das fibras tipo II, no músculo canino, por subclasses parece ser difícil (Latorre et al., 1993). A utilização da técnica ATPase 4,6 no músculo humano permite a subtipificação das fibras

tipo II nos subtipos IIA, IIB e IIC (Costin-Kelly, 2008). Contudo, segundo estudos efetuados por Cardinet, Leong, & Means (1982); Braund et al. (1982); Armstrong et al., (1982) e Green, Reichmann, & Pette (1982) parecem não existir fibras tipo IIB no músculo canino. Por outro lado, Gollnick, Parsons, & Oakley (1983) conseguiram demonstrar a presença de três subclasses de fibras tipo II na espécie canina, fazendo um controlo estrito do tempo de incubação e do pH da solução de pré-incubação da técnica ATPase 4,6. No estudo realizado por Snow et al. (1982), a utilização de técnicas histoquímicas, imunohistoquímicas e bioquímicas, permitiu revelar a existência de fibras tipo IIA e tipo IIDog, um tipo peculiar de fibras presente apenas na espécie canina e que não corresponde às fibras IIB dos outros mamíferos. Por seu lado, Latorre et al. (1993) vieram confirmar que é possível diferenciar três tipos de fibras no cão utilizando a técnica ATPase 4,6, dependendo do método de marcação utilizado. De facto, nesta espécie, a molaridade, a temperatura e o pH da solução de pré-incubação, bem como o tempo de incubação são fatores cruciais para que a subtipificação das fibras seja correta (Snow et al., 1982). Segundo Acevedo & Rivero (2006), o pH ideal da solução de pré-incubação ácida é de 4,45.

No presente trabalho conseguiu-se igualmente a subtipificação das fibras tipo II, maioritariamente em IIA e IIDog, tendo sido utilizado um pH de 4,45 para a solução de pré-incubação. A deteção das fibras IIC não foi possível nas amostras utilizadas, muito provavelmente porque não estão presentes em todos os músculos estudados e porque representam menos de 2% das fibras musculares (Braund et al., 1982). No ser humano, as fibras IIC são raras no tecido muscular saudável, estando presentes em maior quantidade na fase embrionária ou caso surja um processo patológico a nível muscular (Paciello & Papparella, 2009).

A técnica NADH diaforase permite indicar qual a capacidade oxidativa relativa das fibras musculares (Armstrong et al., 1982). No ser humano, obtém-se um padrão em “tabuleiro de xadrez”, ficando as fibras musculares do tipo I coradas de azul escuro e as tipo II coradas de azul claro. O padrão de marcação forma uma rede azul, de distribuição uniforme por toda a fibra muscular (Costin-Kelly, 2008).

No presente estudo, para todos os músculos avaliados, a marcação adquiriu a forma de um ponteadado azul, e não de uma rede, como descrito em medicina humana. Por outro lado, e principalmente nos músculos temporal e masséter, verificou-se que a localização desta marcação se situava, principalmente, a nível subsarcolémico. Caso se tratasse de tecido muscular humano, a rarefação central na marcação da célula muscular seria indicativa de doença por *central core* (Sundaram & Uppin, 2012). Contudo, Armstrong et al. (1982) verificaram que, em vários músculos de cão localizados nos membros, a distribuição do produto de reação para a técnica NADH diaforase variava consoante o tipo de fibra muscular. Para as fibras tipo I, o produto apresentava-se depositado de forma difusa enquanto nas fibras tipo II, a maior acumulação encontrava-se em posição subsarcolémica. No entanto, e apesar do produto da reação se distribuir de forma diferente

consoante o tipo de fibra, Armstrong et al. (1982), com base em estudos bioquímicos, verificou que o potencial oxidativo das fibras tipo I e tipo II é semelhante.

Como os músculos temporal e masséter apresentavam, com base na técnica ATPase 9,4, cerca de 85% e 80% de fibras tipo II, respetivamente, será de esperar que a maioria revele uma marcação pela NADH diaforase mais intensa a nível subsarcolémico. Por outro lado, a presença de fibras musculares de cor azul clara no diafragma e no bíceps femoral vai contra os resultados observados por Armstrong et al. (1982). Contudo, com base nos resultados obtidos por Amann, Wharton, Madsen, & Laughlin (1993) em músculos de cão, também localizados nos membros, verificou-se que as fibras musculares tipo I adquiriam uma cor mais azul escura enquanto as fibras tipo II tinham uma tonalidade mais clara. Tal pode dever-se a diferentes tempos de incubação utilizados nos diferentes estudos. No entanto, o presente trabalho utilizou, para a técnica NADH diaforase, um período de incubação de 60 minutos, visto o período de incubação estandardizado de 30 minutos para o tecido muscular humano ter diferenciado pouco os tipos de fibras musculares na espécie canina, e mesmo assim os resultados variaram consoante o músculo utilizado.

Embora, por rotina, se utilizem as técnicas ATPase 4,6 e 9,4 para a identificação dos tipos de fibras musculares, os resultados obtidos estão dependentes da labilidade da enzima ATPase e não têm capacidade de providenciar informações diretas relativas às isoformas do MHC presentes num determinado tecido muscular (Štrbenc et al., 2006). Em tecido muscular humano normal, a maioria das fibras expressa uma das isoformas *slow* ou *fast* do MHC, correspondendo às fibras musculares tipo I e tipo II, respetivamente, que são demonstradas na técnica ATPase 9,4. Embora a utilização da imunohistoquímica (anticorpos MHC-*slow* e MHC-*fast*) para a marcação destas isoformas não permita diferenciar entre os tipos de fibras IIA e IIB, tem a vantagem de identificar fibras híbridas, que expressam mais do que uma isoforma (Costin-Kelly, 2008).

No presente trabalho, as percentagens dos diferentes tipos de fibras musculares obtidas na técnica ATPase 9,4 foram muito diferentes daquelas encontradas na imunohistoquímica. As principais diferenças encontraram-se nos músculos temporal e masséter, cuja percentagem de fibras tipo II recorrendo à histoquímica deu valores entre os 80% e 85% enquanto que, utilizando o MHC-*fast*, os valores reduziram-se para 3% e 21%. Já a percentagem de células marcadas pelo anticorpo MHC-*slow* apresentou resultados muito semelhantes aos obtidos pela ATPase 9,4. É de salientar também que a percentagem de fibras marcadas pelos dois anticorpos foram as mesmas nos dois músculos, em ambos os canídeos. A baixa percentagem de células marcadas com o anticorpo MHC-*fast* pode estar relacionado com o facto de existirem cinco tipos de fibras musculares distintas, com base na sua composição em isoformas de MHC (Acevedo & Rivero, 2006), sendo que apenas algumas destas fibras marcam pelo anticorpo em questão. No caso dos músculos mastigadores, a principal isoforma expressa é a MHC-2M (Toniolo et al., 2007). Ou seja, o anticorpo MHC-*fast* utilizado pode não ser específico para algumas das isoformas do MHC canino (Smerdu, Štrbenc, Meznaric-Petruša, & Fazarinc, 2005). Relativamente às fibras marcadas terem sido as mesmas com

os dois anticorpos, poderá significar que se trata de fibras híbridas, ou seja, fibras que co-expressam dois tipos de isoformas do MHC, um fenómeno já descrito por Acevedo & Rivero (2006), Štrbenc et al. (2006) e Toniolo et al. (2007) em músculo da espécie canina. Como as fibras musculares marcadas com os dois anticorpos são as mesmas e a intensidade de marcação é maior com o MHC-*slow* pode-se concluir que há uma maior quantidade da isoforma MHC-1 nas fibras marcadas.

Quanto aos músculos diafragma e bíceps femoral, os anticorpos MHC-*slow* e MHC-*fast*, parecem marcar maioritariamente fibras diferentes, obtendo-se um padrão de marcação inverso quando se comparam as imagens da mesma região do corte. Contudo, há fibras que também marcam com ambos os anticorpos, podendo haver a possibilidade de se tratar de fibras híbridas. Por outro lado, mesmo estas fibras musculares apresentam uma intensidade de marcação moderada a forte. Tal permite concluir que a quantidade das isoformas do MHC marcadas por cada um dos anticorpos deverá ser semelhante. Por outro lado, a percentagem de fibras marcadas pelos anticorpos, em ambos os músculos, apresenta valores mais próximos dos obtidos nos músculos temporal e masséter. No entanto, não foi possível comparar imagens do mesmo local de corte da técnica histoquímica com a de imunohistoquímica, de forma a garantir que as fibras musculares do tipo I realmente correspondiam às marcadas pelo anticorpo MHC-*slow* e que as do tipo II correspondiam às marcadas pelo MHC-*fast*. Štrbenc et al. (2006) compararam a expressão das isoformas do MHC com a classificação histoquímica das fibras musculares, que utiliza as técnicas ATPase 9,4 e 4,6. Estes verificaram que apenas as isoformas MHC-1 e MHC-1/2A podiam ser claramente correlacionadas com as fibras tipo I e IIC, respetivamente. Para as outras isoformas MHC-2A e MHC-2X não foi possível estabelecer a correlação entre os tipos de fibras IIA e IIIDog.

Relativamente aos casos clínicos I, II e III de doença muscular verificou-se que não existem relatos na literatura consultada sobre a utilização destas técnicas imunohistoquímicas em casos patológicos. Contudo, em medicina humana, o aumento da expressão de fibras híbridas é indicativo da existência de doença muscular (Costin-Kelly, 2008). É, pois, possível que, o aumento de ambas as marcações MHC-*slow* e MHC-*fast* seja indicativo de doença muscular. De facto, nos casos clínicos I e II, a intensidade de marcação para o MHC-*fast* foi também muito mais forte nos músculos patológicos do que nos normais.

Por se tratarem de casos de arquivo, não foi possível realizar as técnicas histoquímicas nestes casos patológicos pois, seria necessário a utilização de cortes de congelação. Durante a realização do estágio curricular, também não surgiu, no Hospital Escolar da FMV-ULisboa, qualquer caso clínico em que tivesse sido considerado necessário a realização de biópsia muscular.

Por outro lado, os anticorpos utilizados no presente trabalho, por si só, não têm capacidade para obter diagnóstico definitivo de situações de patologia muscular. Para tal seria necessário utilizar mais anticorpos que, no entanto, só iriam funcionar se aplicados em cortes de congelação, visto o tecido muscular fixado em formol poder sofrer alterações de conformação dos seus antígenos ou epítopos (Dubowitz et al., 2013). A título de exemplo, no Laboratório de Neuropatologia do Serviço

de Neurologia do Hospital de Santa Maria são utilizados mais de trinta anticorpos para que seja possível chegar ao diagnóstico da doença muscular em curso.

Para além destas limitações encontradas durante a realização do presente trabalho, também surgiram problemas na congelação do tecido muscular necessário para a realização das técnicas histoquímicas, pois esta requer a utilização de azoto líquido a -160 °C para arrefecer o isopentano onde as amostras são congelados. Acontece que, no Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-ULisboa, as condições logísticas atualmente presentes dificultam o processo de congelação dos fragmentos de músculo num curto espaço de tempo.

Foi também necessário limitar o número de técnicas de histoquímica a aplicar. No Laboratório de Neuropatologia anteriormente mencionado, o painel de análises anátomo-patológicas conta com treze técnicas histoquímicas. No presente trabalho essas técnicas foram limitadas às três consideradas mais relevantes e simultaneamente exequíveis. Apesar destas limitações, foi possível concluir que as três técnicas de histoquímica realizadas têm capacidade para tipificar os tipos e subtipos de fibras musculares existentes no cão.

Se bem que se considere que seria importante efetuar as técnicas em amostras de mais animais da espécie canina, de forma a garantir que os resultados obtidos no presente trabalho realmente retratam as características normais do tecido muscular da espécie, o facto de ter obtido dados idênticos nas quatro amostras de músculo dos dois casos analisados pode ser interpretado como uma garantia suficiente de fiabilidade.

6. Conclusão

Com base nos resultados descritos, podem ser retiradas as seguintes conclusões:

- As técnicas histoquímicas ATPase 9,4 e NADH diaforase podem ser aplicadas no tecido muscular canino para a tipificação de fibras musculares (I e II);
- A técnica ATPase 4,6 permite a subtipificação dos tipos de fibras II, quando o pH da solução de pré-incubação é 4,45;
- O anticorpo MHC-*slow* parece ser específico para a isoforma MHC-1 canina, em todos os músculos (sem doença muscular aparente) avaliadas no presente trabalho;
- Com o anticorpo MHC-*fast* não parece haver reação cruzada com as isoformas *fast* do MHC dos músculos temporal e masséter;
- Não foi possível verificar correlação entre a percentagem de fibras tipo I e II marcadas pela técnica ATPase 9,4 e a percentagem de fibras marcadas em imunohistoquímica, pelos anticorpos MHC-*slow* e MHC-*fast*;
- A imunohistoquímica aplicada ao diagnóstico de casos clínicos de doença muscular exige o recurso a múltiplos anticorpos, possivelmente diversos dos utilizados no presente trabalho;
- Contudo, o decurso do presente trabalho permitiu identificar as condições mínimas que são necessárias disponibilizar no Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-ULisboa para a realização das técnicas histoquímicas, necessárias para obter diagnósticos definitivos de patologia muscular.

Referências Bibliográficas

- Abdou, K. A. (2001). Evaluation of Rigor Mortis and its Application to Assessment of the Postmortem Interval in Dogs. *Assiut University Bulletin for Environmental Researches*, 4(1).
- Acevedo, L. M., & Rivero, J. L. L. (2006). New insights into skeletal muscle fibre types in the dog with particular focus towards hybrid myosin phenotypes. *Cell and Tissue Research*, 323(2), 283–303.
- Acke, E., Jones, B. R., Breathnach, R., Mcallister, H., & Mooney, C. T. (2004). Tetanus in the dog : review and a case-report of concurrent tetanus with hiatal hernia. *Irish Veterinary Journal*, 57(10), 27–31.
- Ackerman, L. (2011). *The Genetic Connection: A Guide to Health Problems in Purebred Dogs* (2nd ed.). Lakewood, Colorado: American Animal Hospital Association Press.
- Adegboye, O. (2015). Extraocular myositis in a female puppy. *Open Veterinary Journal*, 5, 42–44.
- Allgoewer, I., Blair, M., Basher, T., Davidson, M., Hamilton, H., Jandeck, C., Shelton, G. D. (2000). Extraocular muscle myositis and restrictive strabismus in 10 dogs. *Veterinary Ophtalmology*, 3, 21–26.
- Alves, A. P., Dâmaso, A. R., & Pai, V. D. (2008). The effects of prenatal and postnatal malnutrition on the morphology, differentiation, and metabolism of skeletal striated muscle tissue in rats. *Jornal de Pediatria*, 84(3), 264–271.
- Amann, J. F., Wharton, R. E., Madsen, R. W., & Laughlin, M. H. (1993). Comparison of Muscle Cell Fiber Types and Oxidative Capacity in Gracilis, Rectus Femoris and Triceps Brachii Muscles in the Ferret and the Domestic Dog. *The Anatomical Record*, 236, 611–618.
- Armstrong, R. B., Saubert IV, C. W., Seeherman, H. J., & Taylor, C. R. (1982). Distribution of Fiber Types in Locomotory Muscles of Dogs. *The American Journal of Anatomy*, 163, 87–98.
- Baltzer, W. I., Calise, D. V, Levine, J. M., Shelton, G. D., Edwards, J. F., & Steiner, J. M. (2007). Dystrophin-deficient muscular dystrophy in a Weimaraner. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 43(4), 227–232.
- Baroncelli, B., Abellonio, F., Pagano, T. B., Esposito, I., Peirone, B., Papparella, S., & Paciello, O. (2013). Muscular Dystrophy in a Dog Resembling Human Becker Muscular Dystrophy. *Journal of Comparative Pathology*, 150(4), 1–5.

- Bendall, J. R. (1960). Post-mortem Changes in Muscle. In *The Structure and Function of Muscle*. New York: Academic Press.
- Braund, K. G., & Amling, K. a. (1988). Muscle Biopsy Samples for Histochemical Processing: Alterations Induced by Storage. *Veterinary Pathology*, 25(1), 77–82.
- Braund, K. G., Mcguire, J. a., & Lincoln, C. E. (1982). Observations on Normal Skeletal Muscle of Mature Dogs: A Cytochemical, Histochemical, and Morphometric Study. *Veterinary Pathology*, 19(6), 577–595.
- Brellou, G. D., Psychas, V., & Vlemmas, I. (2013). Rhabdomyosarcomas arising from striated muscles in elderly dogs: pathological features of 4 cases. *Journal of Hellenic Veterinary Medical Society*, 64(2), 105–112.
- Brien, P. J. O., Cribb, P. H., White, R. J., Olfert, E. D., & Steiss, J. E. (1983). Canine Malignant Hyperthermia : Diagnosis of Susceptibility in a Breeding Colony. *Canadian Veterinary Journal*, 172–177.
- Brien, P. J. O., Forsyth, G. W., Olexson, D. W., Thatte, H. S., & Addis, P. B. (1984). Canine Malignant Hyperthermia Susceptibility : Erythrocytic Defects Osmotic Fragility , Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency and Abnormal Ca²⁺ Homeostasis, 381–389.
- Burkitt, J. M., Sturges, B. K., Jandrey, K. E., & Kass, P. H. (2007). Risk factors associated with outcome in dogs with tetanus : 38 cases (1987 – 2005). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 230(1), 76–83.
- Cardinet, G. H., Leong, C. L., & Means, P. S. (1982). Myofiber Differentiation in Normal and Hypotrophied Canine. *Muscle & Nerve*, 5, 665–673.
- Carpenter, J. L., Schmidt, G. M., Moore, F. M., Albert, D. M., Abrams, K. L., & Elner, V. M. (1989). Canine Bilateral Extraocular Polymyositis. *Veterinary Pathology*, 512, 510–512.
- Cauduro, A., Paolo, F., Asperio, R. M., Rossini, V., Dondi, M., Simonetto, L., Lorenzo, V. (2013). Use of MRI for the early diagnosis of masticatory muscle myositis. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 49(5), 347–52.
- Cerda-Gonzalez, S. (2010). Disorders of Skeletal Muscle. In S. J. Ettinger & E. C. Feldman (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine: diseases of the dog and the cat. Vol 2*. (7th ed., pp. 4130–4146). Saunders.

- Chang, K.-C., McCulloch, M.-L. C., & Anderson, T. J. (2010). Molecular and cellular insights into a distinct myopathy of Great Dane dogs. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 183(3), 322–7.
- Chapman, S., Nabity, M., & Calise, D. (2008). What is your diagnosis? Lingual mass in a dog. *Veterinary Clinical Pathology*, 37(1), 133–139.
- Clair, L. E. St. (1986). Músculos do Carnívoro. In *Sisson & Grossman: Anatomia dos Animais Domésticos* (5th ed., pp. 1416–1441). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Clark, R. D. (2014). *Medical, Genetic & Behavioral Risk Factors of Bouvier des Flandres* (1st ed.). United States of America: Xilibris Corporation.
- Clooten, J. K., Woods, J. P., & Smith-Maxie, L. (2003). Myasthenia gravis and masticatory muscle myositis in a dog. *Canadian Veterinary Journal*, 44(6), 480–483.
- Collins, D. S., & Huey, R. J. (2015). *Gracey's Meat Hygiene* (11th ed.). Wiley Blackwell.
- Costin-Kelly, N. (2008). Muscle Staining Methods. *The Biomedical Scientist*, 25(2), 1063–1070.
- Cuddon, P. A. (2010). Electromyograph and Nerve Conduction Velocity Studies. In S. J. Ettinger & E. C. Feldman (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine: diseases of the dog and the cat. Vol 1.* (7th ed., pp. 1119–1126). Saunders.
- Davies, A., & Gunn, H. (1972). Histochemical fibre types in the mammalian diaphragm. *Journal of Anatomy*, 112(1), 41–60.
- Dewey, C. W., Bailey, C. S., Shelton, G. D., Kass, P. H., & Cardinet, G. H. (1997). Clinical Forms of Acquired Myasthenia Gravis in Dogs: 25 Cases (1988-1995). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 11(2), 50–57.
- Dickinson, P. J., & LeCouteur, R. A. (2010). Muscle and Nerve Biopsy. In S. J. Ettinger & E. C. Feldman (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine: diseases of the dog and the cat. Vol 1.* (7th ed., pp. 1114–1116). Saunders.
- Dubowitz, V., Sewry, C. A., & Oldfors, A. (2013). *Muscle Biopsy: A Pratical Approach* (4th ed.). London, UK: Saunders Elsevier.
- Dunbar, M. D., Ginn, P., Winter, M., Miller, K. B., & Craft, W. (2012). Laryngeal rhabdomyoma in a dog. *Veterinary Clinical Pathology*, 41(4), 590–593.

- Evans, J., Levesque, D., & Shelton, G. D. (2004). Canine inflammatory myopathies: a clinicopathologic review of 200 cases. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 18(5), 679–691.
- Fawcett, A., & Irwin, P. (2014). Diagnosis and treatment of generalised tetanus in dogs. *In Practice*, 36, 482–493.
- Fors, S. (2006). Neuromuscular manifestations of hypothyroidism in dogs. *Svensk Veterinärtidning*, 14, 11–17.
- Gandi, L., & Vivekanand, S. (2012). Maxillofacial rhabdomyosarcoma in the canine maxillofacial area. *Veterinary World*, 5(9), 565–567.
- Goedegebuure, S. A. (1987). Spontaneous primary myopathies in domestic mammals: a review. *The Veterinary Quarterly*, 9(2), 155–71.
- Gollnick, P. D., Parsons, D., & Oakley, C. R. (1983). Histochemistry Differentiation of Fiber Types in Skeletal Muscle from the Sequential Inactivation. *Histochemistry*, 77, 543–555.
- Gopalakrishna Rao, D. (2010). *A Text Book on Systemic Pathology of Domestic Animals* (1 st). Luclnow, India: IBDC publishers.
- Gordon, I., Shapiro, H. A., & Berson, S. (1988). *Forensic Medicine: A Guide to Principles* (3rd ed.). Edinburgh: Churchill Livingstone.
- Green, H. J., Reichmann, H., & Pette, D. (1982). A Comparison of Two ATPase Based Schemes for Histochemical Muscle Fiber Typing in Various Mammals. *Histochemistry*, 76, 21–31.
- Gregory, B. L., Shelton, G. D., Bali, D. S., Chen, Y., & Fyfe, J. C. (2007). Glycogen Storage Disease Type IIIa in Curly-Coated Retrievers. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 40–46.
- Gross, T. L., & Kunkle, G. A. (1987). The Cutaneous Histology of Dermatomyositis in Collie Dogs. *Veterinary Pathology*, 15, 11–15.
- Hanson, S. M., Smith, M., Walker, T. L., & Shelton, G. D. (1998). Juvenile-Onset Distal Myopathy in Rottweiler Dogs, 103–108.
- Hargis, A. M., Haupt, K. H., Hegreberg, G. A., Prieur, D. J., & Moore, M. P. (1984). Familial Canine Dermatomyositis: Initial Characterization of the Cutaneous and Muscular Lesions. *American Journal of Pathology*, 116, 234–244.

- Harvey, J. W., Mays Calderwood, M. B., Gropp, K. E., & Denaro, F. J. (1990). Polysaccharide Storage Myopathy in Canine Phosphofructokinase Deficiency (Type VII Glycogen Storage Disease). *Veterinary Pathology*, 8.
- Hudgson, P. (1970). The Value of Electron Microscopy in Muscle Biopsies, 63, 470–474.
- Janssen, W. (1984). *Forensic Histopathology* (1st ed.). Giessen, Alemanha: Springer.
- Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2008). Tecido Muscular. In *Histologia Básica* (11^a ed., pp. 182–196). Rio de Janeiro: Guanabra Koogan.
- Kaneko, J. J., Harvey, J. W., & Bruss, M. L. (2008). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* (6th ed.). Florida, USA: Academic Press.
- Kojovic, M., Cordivari, C., & Bhatia, K. (2011). Myoclonic disorders: a practical approach for diagnosis and treatment. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 4(1), 47–62.
- Latorre, R., Gil, F., Vazquez, J. M., Moreno, F., Mascarello, F., & Ramirez, G. (1993). Skeletal muscle fibre types in the dog. *Journal of Anatomy*, 182, 329–337.
- Liptak, J. M., & Forrest, L. J. (2007). Soft Tissue Sarcomas. In S. J. Withrow & G. MacEwen (Eds.), *Small Animal Clinical Oncology* (4th ed., p. 432). St. Louis, Missouri: Elsevier Inc.
- Lobetti, R. G. (2009). Myotonia congenita in a Jack Russell terrier. *Journal of South African Veterinary Association*, 80, 106–107.
- McGavin, M. D., & Valentine, B. A. (2009). Músculo Esquelético. In *Bases da Patologia em Veterinária* (4th ed., pp. 943–1040). Rio de Janeiro: Elsevier.
- Melmed, C., Shelton, G. D., Bergman, R., & Barton, C. (2004). Masticatory Muscle Myositis. *Compendium*, 590–604.
- Meuten, D. J., Calderwood, M. B., Dillman, R. C., Cooper, B. J., Valentine, B. A., Kuhajda, F. P., & Pass, D. A. (1985). Canine Laryngeal Rhabdomyoma. *Veterinary Pathology*, 22, 533–539.
- Morris, J., & Dobson, J. (2001). *Small Animal Oncology* (1st ed.). Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Nguyen, F., Cherel, Y., Guigand, L., Goubault-Leroux, I., & Wyers, M. (2002). Muscle lesions associated with dystrophin deficiency in neonatal golden retriever puppies. *Journal of Comparative Pathology*, 126(2), 100–108.

- Nuijens, F. W. (1997). An electromyographic technique for small animals, *270*, 10–13.
- Paciello, O., & Papparella, S. (2009). Histochemical and immunohistological approach to comparative neuromuscular diseases. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, *47*(2), 143–152.
- Pierson, C. R., Tomczak, K., Agrawal, P., Moghadaszadeh, B., & Beggs, A. H. (2005). X-Linked Myotubular and Centronuclear Myopathies, *64*(7), 555–564.
- Ramos-Vara, J. A., Avery, P. R., & Avery, A. C. (2010). Advanced Diagnostic Techniques. In R. A. Raskin & D. D. Meyer (Eds.), *Canine and Feline Cytology: A Color Atlas and Interpretation Guide* (2nd ed., pp. 395–437). Elsevier Inc.
- Reece, W. O. (2005). *Functional Anatomy and Physiology of Domestic Animals* (3rd ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
- Richardson, D. (2011). Acquired myasthenia gravis in a poodle. *Canadian Veterinary Journal*, *52*, 169–172.
- Risio, L. De, Zavattiero, S., Venzi, C., Bue, M. Del, & Poncelet, L. (2006). Focal canine tetanus : diagnostic value of electromyography. *Journal of Small Animal Practice*, *47*, 278–280.
- Scott, E. M., Teixeira, L. B. C., Flanders, D. J., Dubielzig, R. R., & Mclellan, G. J. (2015). Canine orbital rhabdomyosarcoma : a report of 18 cases. *Veterinary Ophtalmology*, *122*, 1–8.
- Shelton, G. D. (2006). Diseases of muscle and the neuromuscular junction. In J. E. F. Houlton, J. L. Cook, J. F. Innes, J. L.-H. Sorrel, & G. Brown (Eds.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Musculoskeletal Disorders* (pp. 120–127). Dorset, UK: British Small Animal Veterinary Association.
- Shelton, G. D. (2007). Whats new in muscle and peripheral nerve diseases? *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, *20*, 249–255.
- Shelton, G. D. (2010). Routine and specialized laboratory testing for the diagnosis of neuromuscular diseases in dogs and cats. *Veterinary Clinical Pathology*, *39*(3), 278–295.
- Shelton, G. D., & Cardinet, G. H. (1987). Pathophysiologic basis of canine muscle disorders. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *1*, 36–44.
- Shelton, G. D., & Cardinet, G. H. (1990). Canine Mastigatory Muscle Disorders. *Muscle & Nerve*, *8*, 816–819.

- Shelton, G. D., Cardinet, G. H., & Bandman, E. (1987). Canine Mastigatory Muscle Disorders: a study of 29 cases. *Muscle & Nerve*, 10, 753–766.
- Shelton, G. D., Cardinet, G. H., & Lindstrom, J. M. (1988). Canine and human myasthenia gravis autoantibodies recognize similar regions on the acetylcholine receptor. *Neurology*, 38(9), 1417–1423.
- Smerdu, V., Štrbenc, M., Meznaric-Petruša, M., & Fazarinc, G. (2005). Identifi cation of Myosin Heavy Chain I , IIa and IIx in Canine Skeletal Muscles by an Electrophoretic and Immunoblotting Study. *Cells Tissues Organs*, 180, 106–116.
- Snow, D. H., Billeter, R., Mascarello, F., Carpen, E., Rowlerson, A., & Jenny, E. (1982). No Classical Type IIB Fibers in Dog Skeletal Muscle. *Histochemistry*, 75, 53–65.
- Sprott, K. (2008). Generalized tetanus in a Labrador Retriever. *Canadian Veterinary Journal*, 49, 1221–1223.
- Štrbenc, M., Smerdu, V., Pogačnik, A., & Fazarinc, G. (2006). Myosin heavy chain isoform transitions in canine skeletal muscles during postnatal growth. *Journal of Anatomy*, 209, 149–163.
- Sundaram, C., & Uppin, M. S. (2012). Approach to the Interpretation of Muscle Biopsy. In C. Sundaram (Ed.), *Muscle Biopsy* (1st ed., pp. 15–31). Rijeka, Croacia: InTech.
- Swinney, G. R., Foster, S. F., Church, D. B., & Malik, R. (1998). Myotonia associated with hyper-adrenocorticism in two dogs. *Australian Veterinary Journal*, 76(11), 722–724.
- Taylor, S. M. (2008). Disorders of Muscle. In R. W. Nelson & C. G. Couto (Eds.), *Small Animal Internal Medicine* (4th ed., pp. 1108–1118). Mosby Elsevier.
- Toniolo, L., Maccatrozzo, L., Patruno, M., Pavan, E., Caliaro, F., Rossi, R., ... Mascarello, F. (2007). Fiber types in canine muscles: myosin isoform expression and functional characterization. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 292(5), 1915–1926.
- Vleet, J. F. Van, & Valentine, B. A. (2007). Muscle and tendon. In M. G. Maxie (Ed.), *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals* (5th ed., pp. 185–277). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- Walvoort, H. C. (1985). Glycogen storage disease type II in the Lapland dog. *The Veterinary Quarterly*, 7(3), 187–190.

- Webb, A. A., Taylor, S. M., & McPhee, L. (1997). Focal myasthenia gravis in a dog. *Canadian Veterinary Journal*, 38, 493–495.
- Whelan, P. J. (2003). Electromyogram recordings from freely moving animals. *Academic Press*, 30, 127–141.
- Williams, D. (2008). Extraocular Myositis in the Dog. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 38, 347–358.
- Yamate, J., Murai, F., Izawa, T., Akiyoshi, H., Shimizu, J., Ohashi, F., & Kuwamura, M. (2011). A Rhabdomyosarcoma Arising in the Larynx of a Dog. *Journal of Toxicology Pathology*, 24, 179–182.
- Yi, H., Thurberg, B. L., Curtis, S., Austin, S., Fyfe, J., Koeberl, D. D., Sun, B. (2012). Characterization of a canine model of glycogen storage disease type IIIa. *Disease Models & Mechanisms*, 5(6), 804–11.
- Zaher, A. R., & Metz, A. (2009). Canine Cardiac Rhabdomyoma. *Toxicologic Pathology*, 37, 348–350.

Anexo I – Protocolo da técnica de coloração hematoxilina e eosina utilizada após a fixação do tecido muscular em formol.

1. Xilol, 15 min.,
2. Passar 3 vezes em álcool etílico absoluto,
3. Passar 3 vezes em álcool etílico 90°,
4. Passar 3 vezes em álcool etílico 70°,
5. Lavar bem em água destilada,
6. Hematoxilina de Ehrlich, 10 min,
7. Passar 1 vez em água destilada,
8. Álcool clorídrico 1% em álcool a 70° (1 passagem),
9. Água destilada (1 passagem),
10. Água comum até escurecer (cerca de 2 min.),
11. Eosina, 2 min.,
12. Uma passagem em água destilada,
13. Três passagens em álcool etílico 70°,
14. Três passagens em álcool etílico a 90°,
15. Álcool absoluto, 5 min,
16. Xilol, 5 min,
17. Montagem em resina sintética (Entellan®).

Anexo II – Protocolo da técnica ATPase 4,6.

(Adaptado do protocolo utilizado no Laboratório de Neuropatologia do Serviço de Neurologia do Hospital de Santa Maria).

1. Efetuar 3 a 4 cortes de congelação de 10 µm em crióstato, recolhê-los em lamelas e deixar ao ar cerca de 30 minutos.
2. Guardar em arca congeladora (-80 °C) *overnight*.
3. Retirar as lamelas da arca congeladora e deixar ao ar 30 minutos.
4. Incubar com a solução de pré-incubação (pH=4,45) à temperatura ambiente, durante 20 minutos.
5. Incubar com a solução de incubação (pH=10,2) a 37 °C, durante 50 minutos.
6. Manter 10 minutos em cloreto de cálcio a 1%.
8. Manter 10 minutos em cloreto de cobalto a 2%.
9. Passar 7 vezes em água destilada.
10. Passar em sulfureto de amónia 1%.
11. Lavar com água destilada.
12. Desidratar, passar em xilol e montar em Entellan®.

Anexo III – Protocolo da técnica ATPase 9,4.

(Adaptado do protocolo utilizado no Laboratório de Neuropatologia do Serviço de Neurologia do Hospital de Santa Maria).

1. Efetuar 3 a 4 cortes de congelação de 10 µm em crióstato, recolhê-los em lamelas e deixar ao ar cerca de 30 minutos;
2. Guardar em arca congeladora (-80 °C) *overnight*;
3. Retirar as lamelas da arca congeladora e deixar ao ar 30 minutos;
4. Incubar com a solução de pré-incubação (pH=10,35) à temperatura ambiente, durante 25 minutos.
5. Incubar com a solução de incubação (pH=10,2) a 37 °C, durante 35 minutos.
6. Manter 10 minutos em cloreto de cálcio a 1%.
8. Manter 10 minutos em cloreto de cobalto a 2%.
9. Passar 7 vezes em água destilada.
10. Passar em Sulfureto de Amónia 1%.
11. Lavar com água destilada.
12. Desidratar, passar em xilol e montar em Entellan®.

Anexo IV – Protocolo da técnica NADH-diaforase.

(Adaptado do protocolo utilizado no Laboratório de Neuropatologia do Serviço de Neurologia do Hospital de Santa Maria).

1. Efetuar 3 a 4 cortes de congelação de 10 µm em crióstato, recolhê-los em lamelas e deixar ao ar cerca de 30 minutos.
2. Guardar na arca congeladora (-80 °C) *overnight*.
3. Retirar as lamelas da arca congeladora e deixar ao ar 30 minutos.
4. Incubar a solução de incubação a 37 °C, durante 1 hora.
5. Passar 2 vezes por água destilada.
6. Montar em Entellan®.

Anexo V – Protocolo da técnica de imunohistoquímica, recorrendo aos anticorpos primários MHC-*slow* e MHC-*fast*.

1. Colocar os cortes em xilol durante 15 minutos e depois mais 5 minutos (noutra tina) para a sua desparafinação.
2. Efetuar 2 banhos em álcool a 100° durante 4 minutos cada.
3. Efetuar 1 banho em álcool a 95° durante 4 minutos.
4. Efetuar 1 banho em álcool a 70° durante 4 minutos.
5. Recuperação Antigénica.

Anticorpo Primário	Diluição	Recuperação Antigénica (RA)
MHC- <i>slow</i>	1/2000	1. Tampão de RA: EDTA (pH 9,0 e diluição 1/10) *. 2. Micro-ondas, 900 W, 5 minutos. 3. Micro-ondas, 600 W, 15 minutos.
MHC- <i>fast</i>	1/50	
* Foi utilizado 540 ml de água destilada e 60 ml de EDTA.		

6. Arrefecer o recipiente, contendo as lâminas, com água fria durante 30 minutos.
7. Lavar em PBS (5 minutos).
8. Rodear os cortes com caneta hidrofóbica, de modo a limitar a aplicação do reagente à área selecionada.
9. Colocar as lâminas na câmara de incubação horizontal.
10. Inibir a peroxidase endógena, durante 15 minutos, recorrendo à solução de bloqueio *Peroxidase Block* do kit.
11. Lavar em PBS (2 vezes, 5 minutos cada).
12. Bloquear de Proteínas, durante 10 minutos, recorrendo à solução *Protein Block* do kit.
13. Lavar em PBS (2 vezes, 5 minutos cada).
14. Aplicar o anticorpo primário (200 µl/lâmina), com um período de incubação de 1 hora na câmara horizontal, à temperatura ambiente (Tabela 3).
15. Lavar em PBS (2 vezes, 5 minutos cada).
16. Bloquear pós-primário, durante 30 minutos, recorrendo à solução *Post Primary Block* do kit.
17. Lavar em PBS (2 vezes, 5 minutos cada).
18. Incubar com o Polímero *Novolink Polymer* do kit, durante 30 minutos.
19. Lavar em PBS (2 vezes, 5 minutos cada).
20. Revelar com diaminobenzidina (DAB), durante 8 minutos, utilizando o cromogénio DAB+ e o substrato peróxido de hidrogénio na diluição 1/20.
21. Lavar em água destilada (durante 3 minutos).
22. Efetuar a coloração de fundo com Hematoxilina de Mayer durante 30 segundos.

23. Lavar em água destilada (1 a 2 minutos).
24. Passar as lâminas por água corrente tépida, de forma a azular o contraste.
25. Desidratar os cortes em concentrações crescentes de álcool e xilol (processo inverso aos passos 1 a 4), durante 2 minutos cada.
26. Montar em resina sintética (Entellan®).

Anexo VI – Contagem do tipo de fibras musculares (I e II) nos vários músculos, recorrendo à técnica ATPase 9,4.

Temporal	Nº de fibras musculares tipo I	Nº de fibras musculares tipo II
1	20	109
2	17	81
3	25	127
4	18	125
5	15	101
Total	95	543

Total de células contadas: 638.

Percentagem de fibras tipo I: **14,89%**.

Percentagem de fibras tipo II: **85,11%**.

Masséter	Nº de fibras musculares tipo I	Nº de fibras musculares tipo II
1	8	41
2	11	37
3	8	37
4	18	74
5	12	50
Total	57	239

Total de células contadas: 296.

Percentagem de fibras tipo I: **19,26%**.

Percentagem de fibras tipo II: **80,74%**.

Diafragma	Nº de fibras musculares tipo I	Nº de fibras musculares tipo II
1	140	62
2	92	66
3	143	105
4	146	100
5	158	74
Total	679	407

Total de células contadas: 1086.

Percentagem de fibras tipo I: **62,52 %**.

Percentagem de fibras tipo II: **37,48 %**.

Bicípede Femoral	Nº de fibras musculares tipo I	Nº de fibras musculares tipo II
1	23	68
2	82	90
3	11	39
4	89	124
5	13	46
Total	218	367

Total de células contadas: 585.

Percentagem de fibras tipo I: **37,26 %**.

Percentagem de fibras tipo II: **62,74 %**.

Anexo VII – Contagem de células marcadas pelos anticorpos MHC-*slow* e MHC-*fast* em vários músculos do canídeo A.

1. Masséter

MHC- <i>slow</i>	Nº de Células Marcadas	Nº de Células Não Marcadas
1	34	161
2	36	145
3	19	131
4	8	57
5	27	143
Total	124	637

Total de células contadas: 761.

Percentagem de células marcadas: **16,29 %**.

MHC- <i>fast</i>	Nº de Células Marcadas	Nº de Células Não Marcadas
1	38	91
2	18	125
3	10	108
4	19	134
5	36	104
Total	121	562

Total de células contadas: 683.

Percentagem de células marcadas: **17,72 %**.

2. Temporal

MHC- <i>slow</i>	Nº de Células Marcadas	Nº de Células Não Marcadas
1	1	94
2	3	129
3	1	166
4	5	201
5	5	206
Total	15	796

Total de células contadas: 811.

Percentagem de células marcadas: **1,85 %**.

MHC-fast	Nº de Células Marcadas	Nº de Células Não Marcadas
1	2	101
2	8	79
3	0	41
4	3	103
5	3	116
Total	16	440

Total de células contadas: 456.

Percentagem de células marcadas: **3,51 %**.

3. Diafragma

MHC-slow	Nº de Células Marcadas	Nº de Células Não Marcadas
1	145	101
2	207	134
3	159	144
4	103	60
5	175	110
Total	789	549

Total de células contadas: 1338.

Percentagem de células marcadas: **58,97%**.

MHC-fast	Nº de Células Marcadas	Nº de Células Não Marcadas
1	244	202
2	152	123
3	176	104
4	236	176
5	224	148
Total	1032	753

Total de células contadas: 1785.

Percentagem de células marcadas: **57,82 %**.

4. Bicípede Femoral

MHC- <i>s/low</i>	Nº de Células Marcadas	Nº de Células Não Marcadas
1	60	68
2	72	82
3	50	66
4	54	61
5	48	53
Total	284	330

Total de células contadas: 614.

Percentagem de células marcadas: **46,25 %**.

MHC- <i>fast</i>	Nº de Células Marcadas	Nº de Células Não Marcadas
1	57	33
2	94	73
3	77	54
4	89	65
5	91	67
Total	408	292

Total de células contadas: 700.

Percentagem de células marcadas: **58,29 %**.

Anexo VIII – Contagem de células marcadas pelos anticorpos MHC-*slow* e MHC-*fast* em vários músculos do canídeo B.

1. Masséter

MHC- <i>slow</i>	Nº de Células Marcadas	Nº de Células Não Marcadas
1	18	59
2	35	162
3	24	102
4	25	99
5	19	91
Total	121	513

Total de células contadas: 634.

Percentagem de células marcadas: **19,09 %**.

MHC- <i>fast</i>	Nº de Células Marcadas	Nº de Células Não Marcadas
1	15	71
2	16	83
3	15	55
4	15	72
5	14	90
Total	75	371

Total de células contadas: 446.

Percentagem de células marcadas: **16,82 %**.

2. Temporal

MHC- <i>slow</i>	Nº de Células Marcadas	Nº de Células Não Marcadas
1	28	71
2	21	59
3	21	73
4	24	62
5	17	48
Total	111	313

Total de células contadas: 424.

Percentagem de células marcadas: **26,18 %**.

MHC-fast	Nº de Células Marcadas	Nº de Células Não Marcadas
1	22	36
2	23	39
3	8	96
4	13	93
5	16	44
Total	82	308

Total de células contadas: 390.

Percentagem de células marcadas: **21,03 %**.

3. Diafragma

MHC-slow	Nº de Células Marcadas	Nº de Células Não Marcadas
1	130	41
2	99	42
3	91	61
4	78	34
5	81	51
Total	479	229

Total de células contadas: 708.

Percentagem de células marcadas: **67,66 %**.

MHC-fast	Nº de Células Marcadas	Nº de Células Não Marcadas
1	138	159
2	110	181
3	100	118
4	105	137
5	113	159
Total	566	754

Total de células contadas: 1320.

Percentagem de células marcadas: **42,88 %**.

4. Bicípede Femoral

MHC-s/low	Nº de Células Marcadas	Nº de Células Não Marcadas
1	57	57
2	51	50
3	44	42
4	36	37
5	62	48
Total	250	234

Total de células contadas: 484.

Percentagem de células marcadas: **51,65 %**.

MHC-fast	Nº de Células Marcadas	Nº de Células Não Marcadas
1	95	74
2	75	66
3	55	55
4	76	58
5	78	50
Total	379	303

Total de células contadas: 682.

Percentagem de células marcadas: **55,57 %**.

Anexo IX – Contagem de células marcadas pelos anticorpos MHC-*slow* e MHC-*fast*, nos casos clínicos I, II e III.

1. Caso clínico I (masséter)

MHC- <i>slow</i>	Nº de Células Marcadas	Nº de Células Não Marcadas
1	104	124
2	72	93
3	52	86
4	84	191
5	38	124
Total	350	617

Total de células contadas: 967.

Percentagem de células marcadas: **36,19 %**.

MHC- <i>fast</i>	Nº de Células Marcadas	Nº de Células Não Marcadas
1	91	141
2	182	96
3	145	49
4	186	72
5	103	0
Total	707	358

Total de células contadas: 1065.

Percentagem de células marcadas: **66,38 %**.

2. Caso clínico II (masséter)

MHC- <i>slow</i>	Nº de Células Marcadas	Nº de Células Não Marcadas
1	55	0
2	37	0
3	52	87
4	42	64
5	84	66
Total	270	217

Total de células contadas: 487.

Percentagem de células marcadas: **55,44 %**.

MHC-fast	Nº de Células Marcadas	Nº de Células Não Marcadas
1	28	0
2	115	42
3	140	50
4	114	26
5	132	17
Total	529	135

Total de células contadas: 664.

Percentagem de células marcadas: **79,67 %**.

3. Caso clínico III (membro anterior)

MHC-slow	Nº de Células Marcadas	Nº de Células Não Marcadas
1	30	138
2	18	93
3	29	96
4	31	49
5	20	36
Total	128	412

Total de células contadas: 540.

Percentagem de células marcadas: **22,22 %**.

MHC-fast	Nº de Células Marcadas	Nº de Células Não Marcadas
1	110	15
2	128	14
3	111	11
4	161	16
5	108	11
Total	618	67

Total de células contadas: 685.

Percentagem de células marcadas: **90,22 %**.

3. Caso clínico III (membro posterior)

MHC-<i>slow</i>	Nº de Células Marcadas	Nº de Células Não Marcadas
1	26	64
2	24	58
3	27	65
4	30	48
5	22	27
Total	129	262

Total de células contadas: 391.

Percentagem de células marcadas: **32,99 %**.

MHC-<i>fast</i>	Nº de Células Marcadas	Nº de Células Não Marcadas
1	40	14
2	83	23
3	51	13
4	71	27
5	72	26
Total	317	93

Total de células contadas: 410.

Percentagem de células marcadas: **77,32 %**.